

Resúmenes de Congreso

3º Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAProBio 2014)

Auspiciado por:

Universidad Nacional del Litoral / Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas /
Gobierno de Santa Fe / Gobierno de la Ciudad de Santa Fe / Biosidus S.A. /
Diagramma S.A. / Lobov y Cía. S.A.C.I. / Zelltek S.A.

Comité Organizador

Dra. Guillermina Forno (Zelltek S.A. - FBCB-UNL. Santa Fe, Argentina)
Dr. Ricardo Kratje (FBCB-UNL / CONICET. Santa Fe, Argentina)
Dr. Alejandro Trombert (FBCB-UNL. Santa Fe, Argentina)

Comité Científico

Sesión 1

Dr. Sebastián Cavalitto (CINDEFI-CONICET, FCE-UNLP. La Plata, Argentina)
Dr. Martín Blasco (INTI-UNSAM. San Martín, Argentina)
Dr. Alejandro Beccaria (FBCB-UNL. Santa Fe, Argentina)

Sesión 2

Dra. María Ester Lucca (PROIMI, UNT-CONICET. Tucumán, Argentina)
Dra. Lorena Rojas (CINDEFI-UNQ. La Plata, Argentina)
Dr. Horacio Irazoqui (INTEC-FBCB-UNL. Santa Fe, Argentina)

Sesión 3

Dr. Guillermo Castro (CINDEFI, UNLP-CONICET. La Plata, Argentina)
Dr. Edgardo Donati (CINDEFI, UNLP-CONICET. La Plata, Argentina)
Dra. Ana María Gagneten (FICH-UNL. Santa Fe, Argentina)

Sesión 4

Dr. Gustavo Schujman (Bioceres. Rosario, Argentina)
Dr. Martín Salinas (Bioceres. Rosario, Argentina)
Dr. Enrique Mammarella (INTEC, UNL-CONICET. Santa Fe, Argentina)
Dr. Alberto Iglesias (IAL, UNL-CONICET. Santa Fe, Argentina)

Sesión 5

Dr. Mariano Grasselli (UNQ.IMBICE-CONICET. Buenos Aires, Argentina)
Dra. María Laura Carbajal (UNQ. IMBICE-CONICET. Buenos Aires, Argentina)
Dr. Ignacio Amadeo (Zelltek S.A.-UNL. Santa Fe, Argentina)
Dr. Marcelo Fernández-Lahore (Universidad Jacobs. Bremen, Alemania)

Sesión 6

Dr. Guillermo Picó (PROBYQ, UNR-CONICET. Rosario, Argentina)
Dra. Diana Romanini (PROBYQ, UNR-CONICET. Rosario, Argentina)
Dr. Alejandro Trombert (FBCB-UNL. Santa Fe, Argentina)

CONFERENCIAS PLENARIAS

Sesión 1: CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES, VEGETALES O MICROBIANAS EN BIORREACTORES

C1 • Uso de sistemas de cultivo restrictos para la expresión de proteínas recombinantes

Cavalitto, S. F.

Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) CCT LA Plata, CONICET-UNLP. E-mail: cavalitto@quimica.unlp.edu.ar

La producción de proteínas/enzimas de uso biotecnológico es un campo en constante crecimiento en el mundo. El mercado mundial de enzimas y proteínas de uso terapéutico crece año a año así como también la investigación sobre las mismas. En nuestro país se utilizan enzimas en varias industrias tales como la alimentaria (carnes, jugos, frutas), la del curtido de cueros, la del papel, etc. Una vez ubicado un nuevo catalizador, con propiedades novedosas o con suficiente robustez para ser usado en las condiciones deseadas, la producción del mismo debe ser optimizada. En el caso de que el microorganismo silvestre no genere la cantidad suficiente de enzima, el clonado del gen codificante de la misma en un sistema de expresión adecuado es la estrategia más comúnmente seguida. Una vez encontrados los clones con las mejores características de expresión, la producción de la enzima de interés debe ser igualmente optimizada. Un microorganismo recombinante puede considerarse como uno nuevo y con propiedades distintas a la cepa salvaje, por lo que la

optimización de los componentes del medio de cultivo y el estudio del proceso de producción son etapas insoslayables desde el punto de vista tecnológico. Esta nueva tecnología, asociada a los bioprocesos tradicionales ha permitido producir proteínas con actividad terapéutica, de alto valor agregado, o enzimas en mayor cantidad y a menor costo. Los cultivos de alta densidad, es decir de elevada concentración de microorganismos, vienen siendo una de las herramientas para tal fin. Si bien cada sistema de expresión posee sus características particulares, la obtención de grandes cantidades de biomasa del microorganismo hospedador conlleva, indefectiblemente, a mayores concentraciones finales de proteína.

Cuando las proteínas a expresar son de origen eucariótico, las levaduras son la mejor elección ya que poseen los mecanismos de modificación post traduccional necesarios para procesar a las enzimas, poseen una genética conocida, son fácilmente cultivables en medios sintéticos sin mayores requerimientos, poseen elevadas productividades de las proteínas expresadas, altos rendimientos celulares y sus cultivos pueden escalarse sin mayores dificultades ya que, por ser unicelulares, no generan incrementos en la viscosidad de los caldos de fermentación. Además de eso, poseen categoría GRAS.

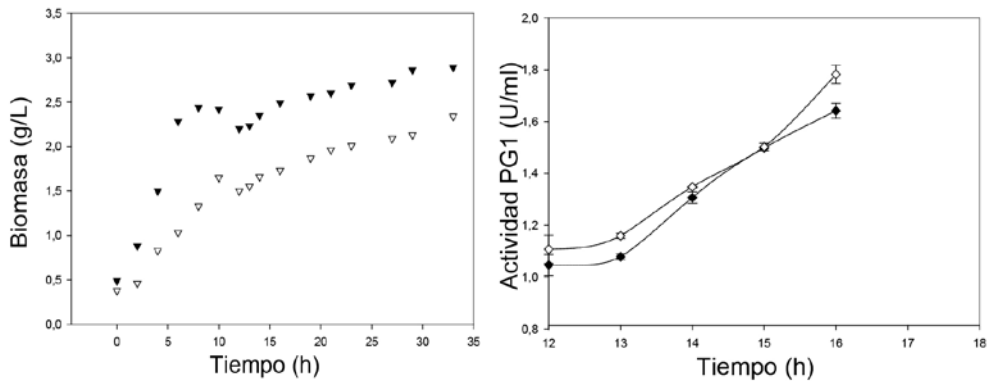
En el presente trabajo se usa como modelo a la expresión de una poligalacturonasa de *Aspergillus kawachii* (PG1) en *Saccharomyces cerevisiae*. El gen de la PG1 se clonó en pYES2[®] Invitrogen, un plásmido de expresión en el que el gen de la proteína a producir se halla bajo el control

del promotor de GAL1, un promotor inducible por galactosa y fuertemente reprimible por glucosa. Luego de seleccionar los clones más adecuados para la expresión de PG1 se procedió a estudiar la expresión de la enzima en distintos sistemas de cultivo.

El primer intento fue siguiendo el protocolo del fabricante, un *batch* de la levadura con rafinosa como FCE seguido de una etapa de inducción con galactosa en

presencia de rafinosa como FCE. Como se observa en la Figura 1 se obtuvo una actividad de 2 U/ml. Dado que la rafinosa es extremadamente cara se buscó una opción para su reemplazo. El segundo protocolo fue un *batch* alimentado con glucosa como FCE seguido de una etapa de inducción con galactosa (con uno y dos pulsos de galactosa). En la Figura 2 se observa el resultado de estos cultivos.

Fig. 1. Perfil de crecimiento y expresión de PG1 con el protocolo de inducción con rafinosa y galactosa en *batch*



Como puede observarse, con este protocolo se obtiene un máximo de 16 U/ml, casi 10 veces más que en el protocolo inicial del fabricante.

Bajo la premisa que una levadura alimentada simultáneamente con dos fuentes de carbono utilizará preferencialmente aquella con la que consiga un mayor μ , se planteó un protocolo en el que se realizó un *batch* alimentado con glucosa para obtener biomasa, luego de lo cual se alimentó con una mezcla equimolar de glucosa y galactosa.

En estas condiciones la glucosa fue utilizada como FCE mientras que la galactosa se acumula en el medio de cultivo e induce la expresión de la enzima. En estas condiciones se obtiene una actividad final de 50 U/ml (Fig 3).

Como puede observarse, el uso de cultivos restringidos (*batch* alimentado) resulta ser una muy buena opción para el cultivo de levaduras recombinantes para la producción de proteínas recombinantes.

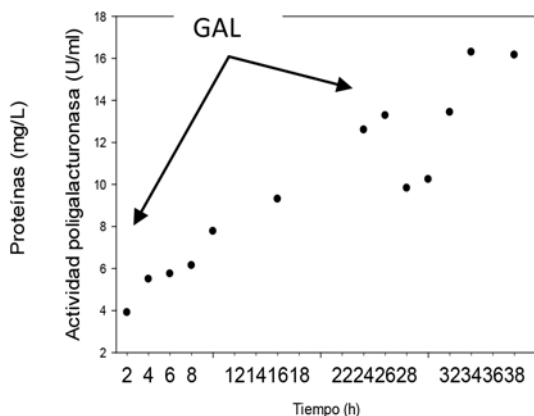


Fig. 2. Perfil de expresión de PG1 con el protocolo de inducción con galactosa luego de un BA.

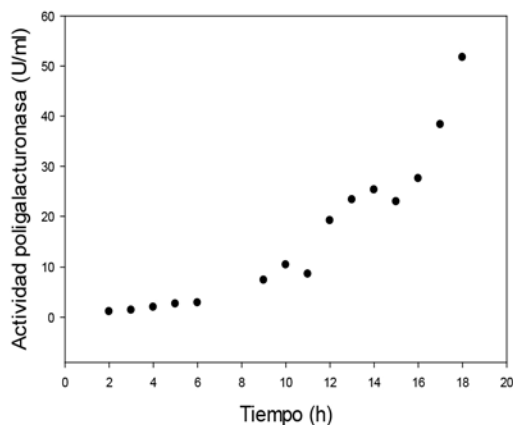


Fig. 3. Perfil de expresión de PG1 con el protocolo de inducción con alimentación simultánea de galactosa y glucosa.

C2 • Empleo de distintos péptidos señales para expresión de proteínas recombinantes en células HEK293, NS0 y CHO-K1

Attallah, C. • Etcheverrigaray, M. • Oggero, M.

Laboratorio de Cultivos celulares. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje "El Pozo" -CC. 242.- (S3000ZAA) Santa Fe. Argentina. E-mail: attallah@fbc.unl.edu.ar

Introducción

La demanda de proteínas terapéuticas recombinantes se expande significativamente. La mayoría de los bioterapéuticos son anticuerpos monoclonales, los cuales se producen generalmente en células animales debido a la necesidad de incorporar modificaciones postraduccionales semejantes a las de las proteínas humanas. Existe, por lo tanto, una constante necesidad de incrementar la productividad de las líneas celulares empleadas para su obtención mediante el desarrollo de modificacio-

nes que optimicen su producción. Por un lado, las células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) son las más utilizadas para tal fin, aunque también se emplean otros tipos de células, como HEK (*Human Embryonic Kidney*) y NS0 de mieloma de ratón. Por otro lado, los péptidos señales (SPs), capaces de dirigir eficazmente la secreción de proteínas, son elementos claves en la producción de proteínas recombinantes, ya que la secreción de proteínas es uno de los pasos limitantes en la productividad de las células animales. Hasta el momento, los estudios realizados para evaluar la eficiencia en la secreción de diferentes SPs se han focalizado en el empleo de células CHO, por lo que resulta atractivo evaluar y comparar dicha eficiencia en otros tipos de células de mamífero. En este trabajo, empleando tres tipos de líneas celulares y diferentes SPs, se evaluó la expresión de GFP (*green fluorescent protein*) y de un fragmento de anticuerpo de formato scFv (*single-chain variable fragment*) fusionado a la región Fc γ_1 de la IgG humana. Tales proteínas fueron empleadas como entidades reporteras del efecto que los diferentes SPs producen a nivel de la productividad de las proteínas recombinantes expresadas en los huéspedes celulares seleccionados.

Metodología

Se construyeron 8 moléculas, productos de la combinación de 4 SPs: AZ (*human azurocidin preproprotein*), mSA (*modified human serum albumin*), mlg κ C (*modified Cricetulus griseus Ig kappa chain V III region MOPC 63-like precursor*), y mlg κ H (*modified human Ig kappa chain V-III region VG precursor*); y 2 proteínas: la proteína repor-

tera GFP y la proteína de fusión scFv-Fc. Se transfectaron en forma transiente y estable las líneas celulares HEK293, NS0 y CHO-K1. En el caso de las transfecciones transientes, 48 horas postransfección se evaluó la expresión de la proteína reportera mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, y la expresión de la proteína de fusión mediante ELISA específico indirecto. En el caso de las transfecciones estables, los cultivos se presionaron con $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de puomicina a fin de seleccionar las células recombinantes que expresan tanto la proteína de interés como la proteína que confiere resistencia al antibiótico. Se evaluó la expresión de la proteína scFv-Fc mediante ELISA específico indirecto. Para cada línea celular se realizaron dos experimentos independientes de transfección.

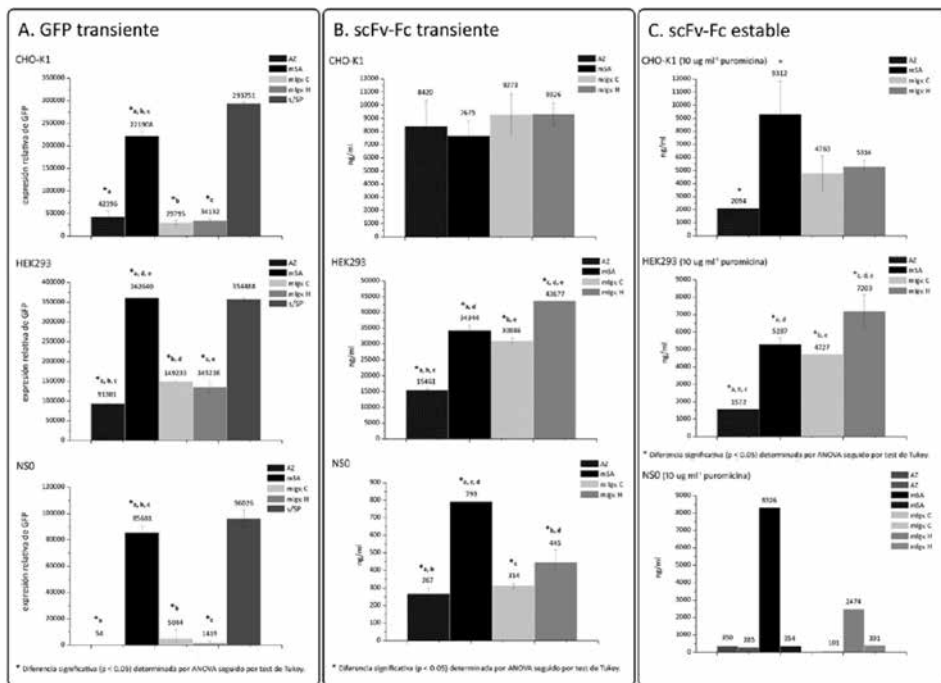
Resultados

En forma transiente, se observó una mayor presencia de la proteína reportera GFP en la vía secretoria de los distintos tipos celulares empleando el SP mSA (Figura 1A).

Respecto de la proteína de fusión scFv-Fc, en las células CHO-K1 se observó la misma expresión con todos los péptidos señales. La productividad celular resultó aproximadamente de $9 \mu\text{g/ml}$. En las células HEK293, el SP mlg κ H mostró la mayor eficiencia ($40 \mu\text{g/ml}$), mientras que en las células NS0, el SP mSA fue el más efectivo ($0,8 \mu\text{g/ml}$) (Figura 1B).

En forma estable, el SP mSA resultó más efectivo en las líneas celulares CHO-K1 ($9 \mu\text{g/ml}$) y NS0 ($1 \mu\text{g/ml}$), mientras que en las células HEK293, el SP mlg κ H ($7 \mu\text{g/ml}$) presentó una mayor eficiencia.

Figura 1. Productividad volumétrica de las distintas líneas celulares en función del péptido señal que dirige cada proteína hacia la vía secretoria



Conclusión

Las productividades más altas para las células HEK293, NS0 y CHO-K1, las cuales son actualmente empleadas para la expresión de proteínas terapéuticas recombinantes, se obtuvieron con los SPs derivados de mSA y de mlgk H. Se corroboró la dependencia entre la eficiencia de los SPs y la secuencia de la proteína contigua ya que se observaron algunas diferencias en la

expresión de GFP y de la proteína de fusión. De todos modos, se pudieron diferenciar los SPs más efectivos en cumplir su función. En este trabajo se demostró que dependiendo del SP empleado en la expresión de una proteína recombinante, fue posible mejorar hasta 5 veces la productividad celular, y que el SP mSA resultó eficiente para todos los tipos celulares empleados.

C3 • Producción de poligalacturonasa por aspergillus sojae en cultivos batch utilizando residuos agroindustriales

Crespo, J. M. • Fratebianchi de la Parra, D. • Cavalitto, S.

Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI-UNLP-CONICET). Calle 50 y 115 (B1900AJL) La Plata, Buenos Aires, Argentina. E-mail: crespo.jm@gmail.com

Introducción

Las frutas resultan de gran importancia en la industria alimenticia y poseen un gran número de consumidores a nivel global. La industria del procesado de frutas incluye aquellas responsables de la producción de jugos de frutas, frutas enlatadas, frutas congeladas, etc. Todas estas industrias conllevan a la generación de desechos, por ejemplo durante los procesos de selección, clasificación y hervido de frutas. Existen dos tipos de desechos, los primeros son residuos sólidos como cáscara y piel, semillas, etc.; los segundos son residuos líquidos de jugos y agua de lavado. Estos tipos de desechos pueden generar serios problemas ambientales y de disposición final. Existe un interés creciente a lo largo de todo el mundo acerca de la utilización eficiente de los residuos agroindustriales que pueden ser bioconvertidos en diferentes productos con alto valor agregado. La pectina forma parte de la pared celular primaria de diferentes frutas, y su función es estabilizar a las microfibrillas de celulosa, así como a otros polímeros y proteínas. Las pectinasas son un grupo de enzimas de diversos tipos encargadas de degradar a la pectina hasta sus compuestos monoméricos elementales. Estas pectinasas son producidas por varios hongos entre las que las del género *Aspergillus* han sido encontrados como una muy buena alternativa para la producción. *Aspergillus sojae* ATCC 20235, un hongo filamentoso que ha sido extensamente utilizado en Japón para la producción de koji, produce actividad pectinolítica cuando crece en medios con residuos vegetales como única fuente de carbono y energía. Para el desarrollo de cualquier proceso fermentativo industrial la optimización del medio de cultivo es de vital importancia

ya que la producción de metabolitos y crecimiento fúngico son fuertemente influenciadas por la composición del medio de cultivo. En el presente trabajo se estudió la expresión de poligalacturonasas por *A. sojae* en medios conteniendo pomasa de damasco y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Metodología

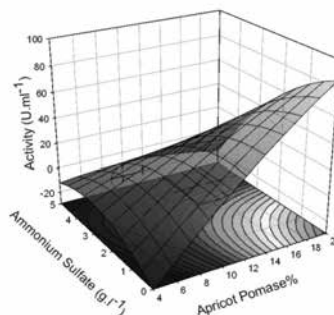
1. Cultivos *batch* en Erlenmeyer: Se realizaron ensayos de optimización de medios de cultivo conteniendo pomasa de damasco como fuente de carbono y energía y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno.
2. Cultivos *batch* en Biorreactor: Se realizaron cultivos *batch* de *A. sojae* en biorreactor de 5 litros modificando las variables operacionales como agitación y aireación de medios de cultivo conteniendo mezcla de cáscara de naranja y pomasa de damasco.
3. Análítica de los cultivos
 - 3.1. Azúcares totales: Se determinaron azúcares por método colorimétrico del fenol-sulfúrico.
 - 3.2. Azúcares reductores: Los azúcares reductores fueron estimados a través de la técnica de Somogyi-Nelson
 - 3.3. Actividad PGasa: Se determinó actividad poligalacturonasa de sobrenadante de cultivos de *A. sojae*. La actividad se determinó midiendo la aparición de poder reductor a través del método de Somogyi-Nelson usando ácido poligalacturónico como sustrato en buffer cítrico/fosfórico a pH 5.

Resultados y Conclusiones

El diseño estadístico de Dohelert para la optimización de medios de cultivo fue utilizado para determinar la combinación óptima de pomasa de damasco y sulfato de amonio. Se realizaron superficies de respuesta para distintos tiempos de cul-

tivo, luego de 122 h de iniciado el cultivo se registraron los máximos valores de Actividad PGasa, obteniéndose valores de actividad de 84 U.ml^{-1} (Fig. 1) sin el agregado de sulfato de amonio. Los valores de actividad en medio líquido resultaron relativamente altos, permitiendo seleccionar al residuo pomasa de damasco como un sustrato capaz de ser utilizado para la producción de enzima.

Fig. 1. Efecto de la concentración de pomasa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre la actividad enzimática



Cultivos *batch* en biorreactor fueron llevados a cabo utilizando cáscara de naranja (un sustrato capaz de inducir la producción de poligalacturonasas) y pomasa de damasco. De acuerdo a datos previos (resultados no mostrados) se utilizó una concentración de

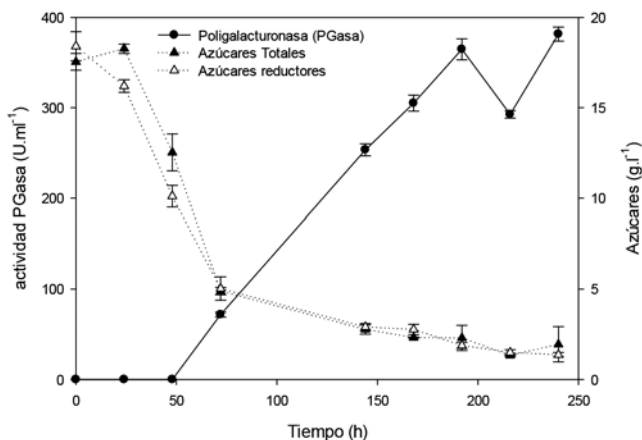
azúcares totales de 21 g.l^{-1} , de los cuales 2/3 fueron aportados por cáscara de naranja y el tercio restante por pomasa de damasco. Se analizaron las variantes mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros operativos de cultivos *batch* en biorreactor

Reactor	Velocidad de Agitación	Aireación	Agitación y Aireación inicial
1	cascada	1VVM	300 rpm/1VVM
2	600 rpm	cascada	600 rpm/0.1VVM
3	600 rpm	1VVM	constante

Los mejores resultados se obtuvieron bajo las condiciones operativas del reactor 2 (Tabla 1), alcanzándose valores de actividad enzimática cercanos a las 400 U.ml^{-1} (Fig.2), mientras que para las condiciones 1 y 3 se obtuvieron 250 U.ml^{-1} y 120 U.ml^{-1} res-

pectivamente. Estos resultados indican que las variables operativas influyen de manera significativa en la producción de la enzima PGasa. Asimismo se encontró una condición de alta producción enzimática.

Fig.2. Actividad enzimática y consumo de fuente de carbono por parte de *A. sojae*

C4 • Optimización de la producción de la enzima EGasa1, capaz de hidrolizar esteril glucósidos en biodiesel

Eberhardt, M. F. • Aguirre, A. • Braia, M. • Peirú, S. • Menzella, H.

Laboratorio de Ingeniería Genética y Tecnología de Fermentación, IPROBYQ-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531 – 2000 Rosario, Argentina. E-mail: eberhardtfllorencia@gmail.com

Introducción

Debido a la demanda creciente por energías limpias, la producción de biodiesel se ha incrementado considerablemente durante los últimos años, y se estima que continuará creciendo durante las próximas décadas. A pesar del potencial de la producción de biodiesel, el producto actual contiene materiales insolubles, denominados esteril glucósidos (EG), que dañan los filtros e inyectores de los automóviles. Si bien han surgido algunos métodos alternativos para eliminar estas impurezas, nin-

guno de ellos ha sido hasta el presente plenamente satisfactorio por razones técnicas y/o económicas. Recientemente el grupo de investigación desarrolló una enzima capaz de eliminar completamente los EG del biodiesel de soja. Este desarrollo permite obtener un biodiesel de altísima calidad utilizando un tratamiento sencillo y amigable con el medio ambiente. La enzima EGasa1 hidroliza completamente los EG para generar esteroides y glucosa. De esta manera, elimina los principales agentes involucrados en la formación de precipitados insolubles en el biodiesel ya que los esteroides son completamente solubles en biodiesel y los azúcares se eliminan en los pasos de lavado acuoso que se llevan a cabo durante el proceso de producción de este combustible.

El objetivo de trabajo es producir la enzima EGasa1 utilizando un proceso de fermentación a un costo que haga viable su implementación industrial.

Metodología

Con el objetivo de incrementar la expresión de EGasa1 a partir del organismo pro-

ductor, *E. coli*, se utilizaron distintas estrategias tales como: la optimización en el uso de codones a través del diseño de genes sintéticos, el uso de una batería de promotores con distinta fuerza de expresión, y la coexpresión de los complejos de chaperonas moleculares DnaK-DnaJ-GrpE, Tig y GroES-GroEL para mejorar el plegamiento de la enzima.

Los plásmidos resultantes de las distintas construcciones alternativas de EGasa1 fueron transformados en *E. coli* BL21AI (DE3). Los cultivos celulares fueron crecidos en medio mínimo salino HM1 hasta $DO_{600}=1$. En ese momento fueron inducidos y crecidos hasta $DO_{600}=4$ simulando las condiciones de fermentación. Las modificaciones se evaluaron midiendo la actividad β -glucosidasa usando el sustrato p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG).

Luego de seleccionar la cepa recombinante con mejores niveles de expresión, se realizó el proceso de producción en lote alimentado a escala piloto. El mismo se llevó a cabo en un fermentador (Infors HT, 3L) con un volumen inicial de 1 litro en medio mínimo salino (HM). El protocolo utilizado consta de una etapa inicial en lote usando glicerol como única fuente de carbono, partiendo de una $DO_{600}=0.6$, y alcanzando una $DO_{600}=20$ luego de 7 horas ($\mu_{\text{máximo}} = 0.4 \text{ h}^{-1}$). La etapa posterior de lote alimentado con glicerol en cantidades limitantes tiene una duración aproximada de 13 horas, donde el μ desciende a 0.25 h^{-1} . El inductor, L-arabinosa 0.4 g/L , se agrega alrededor de las 6 horas de comenzada la alimentación. A partir de ese momento se midió actividad EGasa1 cada hora, finalizando el proceso de fermentación luego de obtener dos medidas iguales.

Resultados

Se ensayaron dos versiones del gen codificante para la EGasa1, diseñados a partir de dos algoritmos alternativos provistos por las empresas Genscript y DNA2.0. El gen diseñado a partir del algoritmo OptimumGene™ de Genscript presentó un rendimiento aproximadamente 10% superior en actividad enzimática respecto al de DNA2.0.

A continuación se decidió ajustar los niveles de transcripción de EGasa1 a fin de que se provea la máxima productividad específica, es decir gramos de EGasa1 por unidad de tiempo, y el crecimiento de la cepa productora se vea afectado en el menor grado posible debido a la carga metabólica provocada por la sobreexpresión del gen *EGasa1*. Para esto, se exploró el uso de una biblioteca de promotores de distinta intensidad. Entre ellos, se seleccionó el promotor BAD ya que con él se logra una expresión compacta de la EGasa1, utilizando un inductor económico como la L-arabinosa. Adicionalmente, con la incorporación del sistema de chaperonas moleculares GroES - GroEL se consiguió incrementar cuatro veces la actividad de la enzima.

La etapa de ingeniería genética y biología sintética proveyó la cepa óptima para desarrollar el proceso de producción en lote alimentado. El resultado de este proceso de fermentación, de 20 horas de duración, es un cultivo con una densidad óptica final de 180 UA, una actividad EGasa1 de 150 UI/ml (equivalente aproximadamente 10 g/L de proteína), un rendimiento de biomasa $Y_{X/S} = 0.43 \text{ g/g}$ y un rendimiento de enzima $Y_{P/X} = 1.89 \text{ UI/g}$.

La enzima fue probada en ensayos de hidrólisis en emulsiones biodiesel/agua, y luego el biodiesel fue sometido a cromato-

grafía gaseosa para comprobar la eliminación de los esteril glucósidos, evidenciando hidrólisis total de los mismos.

Conclusiones

En el presente trabajo se optimizó la expresión de la enzima EGasa1 en *E. coli*, obteniendo 10 g/L de proteína en la fermentación.

La alta productividad volumétrica (actividad EGasa1 por unidad de volumen por tiempo) de la cepa desarrollada, sumada al uso de reactivos de muy bajo costo como el glicerol (en comparación a la glucosa, fuente de carbono preferida para fermentar *E. coli*) y la arabinosa, hacen de la misma una buena candidata para su producción industrial para el tratamiento de biodiesel.

C5 • Optimización de la expresión de fosfolipasa C en *Pichia pastoris* para su utilización en desgomado enzimático de aceite de soja

Elena, C. • Ravasi, P. • Cerminati, S. • Menzella, H. • Castelli, M.E.

Laboratorio de Ingeniería Genética y Tecnología de Fermentación (IPROBYQ-CONICET). Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531 – 2000 Rosario, Argentina. E-mail: mecastelli@fbioyf.unr.edu.ar

Introducción

Los aceites vegetales crudos, obtenidos por prensado o extracción con solventes, son una mezcla compleja compuesta por triacilgliceroles, fosfolípidos, esteroides, tocoferoles y ácidos grasos libres. Los aceites vegetales deben ser refinados para ser aptos para el consumo en alimentos o para aplicaciones tales como la generación de biodiesel. La remoción de los fosfolípidos o "desgomado" genera la mayor pérdida asociada al refinamiento del aceite. Los fosfolípidos pueden ser parcialmente o completamente removidos del aceite vegetal utilizando diferentes métodos tales como: desgomado por agua, tratamiento con

ácido o desgomado enzimático. Durante el desgomado por agua, la hidratación de los fosfolípidos o "gomas" produce la formación de una emulsión que puede ser separada por centrifugación. Las gomitas provenientes de desgomado acuoso retienen hasta un 20% de aceite que no puede separarse físicamente o ser recuperado de la emulsión y representa una pérdida significativa del proceso.

Una alternativa a este proceso es el desgomado enzimático, el cual utiliza fosfolipasas para hidrolizar los fosfolípidos facilitando de esta forma la remoción de los mismos con el agua. En particular, la fosfolipasa C (PLC) cataliza la hidrólisis del grupo fosfato de la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, generando diacilglicerol soluble en el aceite y los grupos fosfatos hidrosolubles. La utilización de este proceso supone un aumento en el rendimiento de la refinación y una reducción en el desecho acuoso.

Metodología

Se utilizó la levadura metilotrofa *Pichia pastoris* GS115 como sistema de producción de una enzima PLC recombinante derivada de *Bacillus cereus*. Este gen se clonó en el plásmido de expresión pJ912 (DNA2.0), el cual utiliza el promotor fuerte

inducible por metanol AOX1 y la secuencia α -factor para lograr que la enzima sea secretada. Este plásmido fue linealizado y transformado mediante electroporación en *P. pastoris*, obteniendo clones estables por integración homóloga. El número de copias integradas se estableció por técnicas de *real-time* PCR.

Se utilizaron distintas estrategias de ingeniería genética sobre los clones obtenidos con el objetivo de incrementar los rendimientos en la expresión de PLC, tales como la optimización en el uso de codones a través del diseño de genes sintéticos encargadas a compañías especializadas (Genscript y DNA 2.0). La selección de los clones más productivos se realizó a través de ensayos de actividad fosfolipasa en placa y por métodos cuantitativos utilizando el sustrato cromogénico (p-nitrofenil-fosfatidilcolina).

Mediante la co-expresión con chaperonas o proteínas que ayudan al plegado y procesamiento pueden lograrse aumentos en la secreción de proteínas heterólogas. Se evaluó la co-expresión de SSA4, BMH2, SSO2, PDI, Hac1 y Kex2 en los clones previamente seleccionados.

Una vez seleccionados los mejores clones, se procedió a la optimización de la producción mediante estrategias de fermentación en *fed-batch* para la obtención de esta enzima en escala piloto.

Resultados

Uno de los factores ampliamente estudiados que afectan la eficiencia de expresión de proteínas heterólogas es el uso de secuencias con codones optimizadas según el sistema de expresión utilizado. Para esto, se encargó la síntesis y optimización para la expresión en *P. pastoris* del gen de PLC de *B. cereus* en dos compañías

especializadas (Genscript y DNA2.0). Al comparar clones con una única copia integrada, se observó que la versión de Genscript presenta un nivel de actividad 20% superior con respecto a la versión de la otra compañía.

Se observó además una relación directa entre la cantidad de copias integradas del gen y la producción de enzima recombinante. Ensayos en modalidad “*high throughput*”, utilizando microplacas de pocillos profundos para el cultivo de las diferentes transformantes de *Pichia* conteniendo el gen de interés, permitieron encontrar el clon más productivo. Se determinó que dicho clon contenía 6 copias del gen de la PLC integrada en forma estable.

Posteriormente a la selección de este clon, se ensayó la co-expresión de chaperonas moleculares y factores “*helpers*” que intervienen tanto en procesos de síntesis, procesamiento y secreción proteica. Se observó que la co-expresión de Hac1, factor de transcripción involucrado en la vía UPR (unfolded protein response) incrementa en promedio unas 3 veces la expresión de PLC.

A lo largo de este proceso de selección se logró obtener un clon altamente productivo el cual fue utilizado para realizar un cultivo de alta densidad en un fermentador de 3 litros con el objetivo de optimizar este proceso en una escala piloto. Para ello se utilizó un protocolo que consta de 3 etapas, una inicial en *batch* con glicerol como fuente de carbono; una etapa de *fed-batch* con glicerol en cantidades limitantes y una etapa de *fed-batch* con metanol el cual funciona como fuente de carbono e inductor. A partir de la misma se logró obtener luego de 65 horas una concentración de 7 g/l de proteína recombinante en el sobrenadante. Este valor representa un elevado rendi-

miento y posibilitaría el escalado industrial de este proceso.

La funcionalidad de la enzima PLC obtenida mediante este procedimiento quedó evidenciada en ensayos de desgomado enzimático en aceite crudo de soja. El estudio de estas muestras tratadas a través de técnicas de ^{31}P -RMN permitió comprobar la hidrólisis completa de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

Conclusiones

Se logró expresar la fosfolipasa C de *B. cereus* utilizando cultivos de alta densidad de *Pichia pastoris*, obteniéndose un valor de 7 g/l de proteína secretada. Este rendimiento facilitará el proceso de *downstream* y posibilitará su adaptación para la producción de fosfolipasa para su uso en el proceso industrial de desgomado enzimático de aceite crudo de soja.

C6 • Producción de antraquinonas en raíces transformadas de *Rubia tinctorum* en un biorreactor de tanque agitado modificado

Perassolo, M. • Cardillo, A. B. • Giulietti, A. M. • Rodríguez Talou, J.

Cát. de Microbiología Industrial y Biotecnología - Instituto de Nanobiotecnología NANO-BIOTEC (CONICET), Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA – Junín 956 6° piso; CABA, CP: 1113. Email: mariap@ffyb.uba.ar

Introducción

Las antraquinonas (AQs) son metabolitos secundarios que, además de haber sido utilizados tradicionalmente como colorantes en la industria, presentan numerosas aplicaciones terapéuticas. Entre ellas, cabe mencionar su actividad antitumoral y para el tratamiento de la Hepatitis C. Actualmente, son producidas principalmente por síntesis química, aunque hay una tendencia hacia una "química verde", sustentable, que promueve el desarrollo de procesos que minimicen el uso y generación de sustancias peligrosas, disminuyendo así los efectos adversos sobre el medio ambiente. Por este

motivo, una alternativa para su obtención es el cultivo *in vitro* de especies vegetales productoras, como por ejemplo el cultivo de raíces transformadas. Este tipo de cultivo, obtenido por infección del tejido vegetal con *Agrobacterium rhizogenes*, presenta una alta velocidad de crecimiento con independencia del agregado de reguladores de crecimiento, ausencia de geotropismo, alto grado de ramificación, y capacidad para producir metabolitos secundarios por largos períodos de tiempo.

En este trabajo se buscó optimizar la producción de AQs en cultivos de raíces transformadas de *Rubia tinctorum* mediante la selección del medio de cultivo y la elicitación, para finalmente escalar la producción en un biorreactor de tanque agitado.

Metodología

Las raíces fueron obtenidas por infección de explantos de *R. tinctorum* con *A. rhizogenes* LBA 9402. Fueron cultivadas en medio sólido y líquido, en condiciones controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo (16 h) y agitación (100 rpm). La transformación se confirmó por PCR.

- Curva de crecimiento y selección de medio de cultivo: Se ensayaron dos medios

de cultivos diferentes: *Lloyd & Mc Cown's Woody Plant Medium* (WPM) y Gamborg B5, con la mitad de la concentración salina (B5_{1/2}), con el agregado de sacarosa (20 g/l). Se inocularon ~0,25 g de raíces en erlenmeyers de 100 ml con 25 ml de medio de cultivo. Se tomaron muestras a los 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días, y se realizaron las siguientes determinaciones analíticas: biomasa (como peso fresco, PF), pH, conductividad, AQS (intra y extracelulares), sacarosa, fructosa y glucosa. Además se calculó el índice de crecimiento y parámetros cinéticos y estequiométricos de cada cultivo.

- Ensayos de elicitación: se realizaron en cultivos de raíces en medio B5_{1/2} (~0,25 g de raíces con 25 ml del medio en erlenmeyers de 100 ml). Las raíces fueron cultivadas por 14 días en las condiciones habituales, y al cabo de este tiempo se elicizó con metil jasmonato (MeJ) 100 mM. Se tomaron muestras al momento de elicitar y a los 2, 4, y 7 días postelicitación (dpe). En todos los casos, se determinaron: biomasa, pH y AQS intra y extracelulares.

- Escalado: Se utilizó un biorreactor de tanque agitado (BIOFLO III, New Brunswick Scientific) adaptado para el cultivo de raíces (añadido de una malla plástica plegada en forma de zig-zag alrededor de los *baffles*). Se inocularon ~10 g de raíces cultivadas en WPM en 1,1 l de medio B5_{1/2}. La agitación se realizó para lograr una distribución uniforme de las raíces (150 rpm; 5 minutos). La aireación se mantuvo entre 0,2-0,3 vvm. A los 15 días de cultivo, las raíces fueron elicitadas con 100 μ M de MeJ y fueron cosechadas a los 7 dpe. Se realizó la determinación de: pH, conductividad, sacarosa, glucosa y fructosa (en medio de cultivo), y de AQS (intra y extracelulares). En paralelo se llevó a cabo un ensayo en erlenmeyers.

Resultados

- Selección del medio de cultivo: Las raíces cultivadas en WPM presentaron una mayor velocidad específica de crecimiento, lo que se tradujo en una mayor producción de biomasa (58,6% superior al cabo de 42 días; $p < 0,001$), en comparación con el cultivo en B5_{1/2}. La producción de AQS (μ mol/g PF) fue superior en B5_{1/2} comparado con WPM a partir de los 14 días y hasta el final del ensayo (entre 20 y 100% superior; $p < 0,05$), mientras que al evaluar la producción volumétrica (μ mol/l), se obtuvieron niveles similares en ambos medios. El contenido intracelular máximo en WPM fue $6,7 \pm 0,9 \mu$ mol/g PF (28 días), y en B5_{1/2} fue $12,0 \pm 1,8 \mu$ mol/g PF (42 días). En WPM, las AQS liberadas no superaron el 1% del total (35 días), mientras que en B5_{1/2}, llegó a un 10% a los 42 días. En la tabla se indican los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos en ambos casos.

Parámetro	WPM	B5 _{1/2}
μ (d ⁻¹)	0,11	0,10
Biomasa final (g/l)	151	95
$Y_{X/S}$ (gX/gS)	7,05	4,30
$Y_{P/X}$ (μ mol AQS/gX)	10,8	18,5
q_s (gS/gX.d)	0,016	0,023
q_p (μ mol AQS/gS.d)	1,12	1,85
P (μ mol AQS/l .d)	33,4 (28 d)	32,6 (35 d)

Dada la mayor liberación de AQS observada en B5_{1/2}, se eligió este medio para continuar con los ensayos de elicitación.

- Ensayos de elicitación: La elicitación con MeJ 100 μ M no resultó en diferencias significativas en la producción de biomasa con respecto a los controles durante todo el período de tiempo estudiado. En presen-

cia de MeJ, el contenido intracelular de AQs mostró incrementos del 50% ($p < 0,01$) 73% ($p < 0,01$) y del 110% ($p < 0,05$) a los 2, 4 y 7 dpe, respectivamente. El contenido extracelular de AQs también se vio afectado por la elicitación, observándose una fracción soluble y otra insoluble: la fracción insoluble de AQs representó un 63, 56 y 38% del total de AQs liberadas a los 2, 4 y 7 dpe, respectivamente. Con respecto al total de AQs, la fracción liberada (solubles + insolubles) representa el 27, 23 y 17% a los 2, 4, y 7 dpe, respectivamente. Teniendo en cuenta todo esto, el tratamiento de las raíces transformadas con MeJ resultó en aumentos del 57, 110 y 127% en la producción total de AQs (AQs IC + AQs EC sol + AQs EC insol) a los 2, 4 y 7 dpe, respectivamente ($p < 0,05$).

- Escalado: El proceso llevado a cabo en el biorreactor de tanque agitado adaptado mostró resultados comparables a los obtenidos en los erlenmeyers, tanto en la biomasa final alcanzada (28,3 y 25,9 g PF/l, respectivamente), como al contenido intracelular de AQs al cabo de 7 días de elicitación con MeJ (24,4 y 27,0 $\mu\text{mol/g}$ PF, respectivamente). La única diferencia observada fue en el contenido extracelular insoluble, que fue un 42% menor en el biorreactor, debido posiblemente a la adsorción de las AQs a la malla plástica, a los precintos empleados para sujetarla, y también a los componentes del biorreactor de acero inoxidable.

Conclusiones

Se estableció un cultivo de raíces transformadas de *R. tinctorum* y se seleccionó un medio más adecuado para la obtención de AQs. Así, se observó que en medio B5_{1/2}, se logró una menor acumulación de biomasa pero una mayor capacidad de producción de AQs en comparación a lo obtenido en WPM, alcanzándose productividades volumétricas similares en ambos casos.

El MeJ demostró ser un potente elicitor de la producción de AQs en raíces transformadas de *R. tinctorum*, alcanzándose una productividad volumétrica total de estos metabolitos secundarios entre 2,3 y 4,5 veces superior con respecto a los cultivos de raíces sin elicitar. Además, el MeJ ocasionó una intensa liberación de AQs al medio de cultivo, que llegó a representar el 50% del total de AQs producidas. Este hallazgo es sumamente interesante para la potencial purificación de estos metabolitos, ya que la extracción a partir del medio de cultivo sería más sencilla.

Finalmente, se lograron combinar las estrategias de selección de medio de cultivo y elicitación para el escalado el cultivo de raíces de *R. tinctorum*. Se realizó el cultivo en un biorreactor de tanque agitado adaptado para el cultivo de estas raíces, obteniéndose rendimientos de producción de biomasa y AQs similares a los obtenidos en el cultivo en erlenmeyers. Con respecto a la recuperación de las AQs extracelulares solubles, debería evaluarse una estrategia alternativa de recuperación o un rediseño del biorreactor.

Sesión 2: DISEÑO DE BIORREACTORES Y ESCALADO DE PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

C1 • Diseño y optimización de bioprocesos microbianos, escalamiento y transferencia al sector productivo

Lucca, M. E.

^a PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos) - CONICET, Belgrano y Caseros, 4000 Tucumán, Argentina, Tel. +54 381 4344888 ext. 37

^b Microbiología Superior, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Ayacucho 471, 4000 Tucumán, Argentina.

E-mail: mariaesterlucca@gmail.com

Los resultados científicos con potencialidad de convertirse en desarrollos de interés tecnológico deben ser transferidos al sector empresarial de la región para mejorar productos ya existentes o generar nuevos bienes y servicios relacionados con la biotecnología microbiana. La vinculación tecnológica entre academia e industrias requiere de una metodología de comunicación acorde y de documentación adecuada para el intercambio de conocimiento. Existen acuerdos de confidencialidad, convenio de desarrollo de I+D+i, servicios de asistencia técnica, patentes y asesorías que generan el marco legal para dicho intercambio. El diseño y optimización de bioprocesos con hongos filamentosos, levaduras y bacterias y su posterior escalamiento en planta piloto permite evaluar la factibilidad técnica y la viabilidad comercial de los mismos. La biotecnología microbiana permite obtener el mejor catalizador biológico

para una función específica, el mejor ambiente para dicha función mediante diferentes estrategias utilizando herramientas tecnológicas y el correcto procesamiento del producto. Cualquiera sea el producto que se desee obtener son varios los aspectos que deben considerarse: selección de una cepa microbiana apropiada; determinación de los valores óptimos de temperatura, pH, presión osmótica; requerimiento de oxígeno; optimización de los requerimientos nutricionales y de la concentración de biomasa producida y eventual modificación del genoma tendiente a incrementar la formación del producto deseado. Los factores que afectan el rendimiento de biomasa son: vía metabólica funcional, velocidad específica de crecimiento, disponibilidad fluctuante de nutrientes, presencia de desacomplantes, limitación de nitrógeno o carbono y limitación simultánea. El diseño del proceso debe anticipar los efectos del escalamiento, introducir las variaciones requeridas en el diseño de los equipos cuando varía su tamaño, determinar las condiciones de trabajo, evaluar cambios de condiciones operacionales asociados a procesos industriales, evaluar la factibilidad económica del proceso y obtener producto en cantidad suficiente para la prospección de mercado o registro del mismo.

La optimización del proceso requiere seleccionar el sistema de cultivo más apropiado, minimizar el tiempo, maximizar la eficiencia energética, conseguir altos coeficientes de transferencia de masa y calor y maximizar el consumo de sustrato y la recuperación del producto. Con respecto al escalado del proceso, y en base a los principios de semejanza entre dos biorreactores, establecer los criterios de ampliación de escala y seleccionar aquel que mayor

impacto tenga sobre la productividad del proceso. Dichos criterios son: constancia de potencia por unidad de volumen de medio sistemas no aireados (P/V); constancia de coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$); constancia de velocidad periférica del agitador (V_{tip}); constancia de tiempo de mezclado (t_M); constancia de capacidad de bombeo del rotor (F_L/V); constancia de Número de Reynolds (N_{re}) y constancia de presión parcial o concentración de oxígeno disuelto (C). Por último, debe tenerse en cuenta que cada

bioproceso requiere un estudio exhaustivo de las condiciones óptimas de producción a escala de banco y luego debe diseñarse el escalado de manera de obtener la misma productividad y la misma eficiencia de recuperación del producto final, sea éste biomasa o un metabolito producido por la misma. Con respecto a los sistemas de cultivo, lote, lote alimentado o continuo, la selección debe realizarse en base a la influencia de la disponibilidad de sustrato y el efecto de su concentración sobre el metabolismo microbiano.

C2 • Optimización estadística de variables de fermentación para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* usadas como aditivos alimentarios probióticos en producción animal

Fochesato A.^{1,2} • Cavaglieri L.^{1,2} • Dogi C.^{1,2}
• Pereyra C.^{1,2} • Cerrutti P.³ • Galvagno M.^{3,4}

1 Departamento Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36, km 601, (5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentina. analiafochesato@gmail.com

2 Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

3 Facultad de Ingeniería-UBA

4 IIB-INTECH-UNSAM-CONICET

E-mail: analiafochesato@gmail.com

Introducción

La implementación de diseños experimentales basada en análisis estadísticos provee una alternativa a los ensayos clásicos para desarrollar procesos fermentativos multivariables con mayor eficiencia. Esta metodología determina el subconjunto de variables que influyen significativamente

sobre un proceso biotecnológico. El objetivo de este trabajo fue seleccionar niveles de las variables críticas de crecimiento de *S. cerevisiae* para obtener una mayor producción de biomasa en el proceso fermentativo.

Metodología

Se utilizó *S. cerevisiae* probiótica aislada de intestino de cerdo. Los ensayos de cinética del crecimiento se realizaron en medio YPD o YPD reemplazando la glucosa con 2% (m/v) de glicerol/etanol. Se incubó a 28°C, 160 rpm durante 52 h en frascos Erlenmeyer con una relación de volumen de frasco a volumen de medio de 10:1. Las condiciones de aireación se mantuvieron durante los ensayos posteriores. En las muestras, tomadas cada 4 h se evaluó producción de biomasa (DO_{600nm}). Se determinaron los parámetros cinéticos, velocidad específica de crecimiento μx (h^{-1}) y tiempo de duplicación td (h). Se utilizó el diseño de selección de Plackett-Burman (PBDS) para evaluar el efecto de las variables independientes sobre el crecimiento de la levadura. Los parámetros analizados fueron concentración de melaza de caña de azúcar (51 % m/m azúca-

res fermentecibles CMZ_{51AF}); concentración de macerado de maíz (CSL) como fuente de nitrógeno; concentración de extracto de levadura (YE) como suplemento vitamínico; temperatura, tiempo de incubación y tamaño del inóculo. Con las variables significativas en el PBSD se llevó a cabo un diseño de optimización de Box Behnken (BBOD).

Resultados

La cepa de *S. cerevisiae* utilizada aprovechó la glucosa a mayor velocidad que el glicerol y el etanol, obteniéndose en glucosa una μ_{max} 0.4 h^{-1} y un td 1.7 h. Los primeros PBDS mostraron que la temperatura óptima de crecimiento fue 28-30°C y que el tamaño del inóculo 0.01-0.1 % no arrojó diferencias significativas. Luego, se llevaron a cabo PBSD para evaluar la influencia de la concentración de CMZ_{51AF} , la del CSL

y la del YE a distintos tiempos. Las variables de proceso que presentaron influencia muy significativa ($p < 0.0007$) fueron las concentraciones de CMZ_{51AF} , CSL, y YE ($p < 4.8 \cdot 10^{-5}$). Con las variables que resultaron significativas en el PBSD se realizó un BBOD donde los valores máximos de producción de biomasa ($DO_{600 \text{ nm}} = 38$) se alcanzaron con (% m/m) 10-12, 8, 05 para CMZ_{51AF} , CSL y YE respectivamente luego de 60 h de fermentación.

Conclusión

Es posible producir biomasa a altas densidades celulares usando subproductos agroindustriales económicos. El resultado indica la importancia de las herramientas estadísticas para el diseño de las condiciones de cultivo para escalar la producción de esta levadura.

C3 • Optimización de un medio de cultivo para maximizar el contenido lipídico en *Chlorella sp.* Escalamiento en un biorreactor tipo *air-lift*

Giordano, P. C. • Goicoechea, H. • Beccaria, A.

Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría y Laboratorio de Fermentaciones, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Paraje "El Pozo" CC 242, Santa Fe, Argentina. E-mail: pgjordano@fiq.unl.edu.ar

extraído desde vegetales oleaginosos, lo cual puede implicar la distracción de recursos alimenticios y el empobrecimiento de suelos. Una alternativa al empleo de estos vegetales es el uso de microorganismos oleaginosos, productores de "aceite unicelular". Para incrementar los rendimientos y reducir los costos en los procesos de cultivo heterotróficos de estos microorganismos es útil la aplicación de herramientas quimiométricas y el uso de recursos de bajo valor económico.

Metodología

Se empleó una cepa de *Chlorella sp.* que se mantuvo en medio Bold 3N modificado (B3NM) a 20°C. Los cultivos se realizaron en frascos Erlenmeyer, en condiciones estáticas durante 10 días, con una densidad

Introducción

El biodiesel es un biocombustible líquido que consiste en ésteres de monoalcoholes de cadena corta con ácidos grasos, los que se obtienen principalmente del aceite

celular inicial de 5×10^5 céls mL^{-1} , se incubaron a 30°C y se inocularon con una alícuota de un cultivo desarrollado en B3NM.

La biomasa se cuantificó por conteo en cámara, y el contenido de lípidos aplicando una técnica espectrofluorimétrica. Brevemente, se realizó una curva de calibración empleando aceite comercial de girasol disuelto en una mezcla de 20% isopropanol y 80% agua (ISO-A) como estándar. Luego de adicionar Rojo de Nilo (100 mgL^{-1}) a dicho estándar, la mezcla se incubó durante 2 min a temperatura ambiente y se procedió a determinar la intensidad de fluorescencia en un espectrofluorímetro (Precisely LS55, Perkin Elmer, EE. UU.).

Se planteó un diseño central compuesto considerando 3 factores: concentración de fuente de carbono (glucosa) (5-50 g/L) (CC), relación fuente de carbono/ fuente de nitrógeno (extracto de levadura) (10-50) (CN) y concentración de sulfato de cobre (0-1 mg/L) (Cu); y 2 respuestas: 1-densidad celular ($\times 10^6$ céls /mL) (DC) y 2-concentración de lípidos (ppm) (L).

Los datos se analizaron usando un software de diseño experimental. Una vez obtenido un modelo satisfactorio para explicar la variabilidad en las respuestas, se aplicó la función deseabilidad para obtener una combinación óptima de factores que permitiera maximizar la acumulación de lípidos.

Finalmente, el medio optimizado se escaló en un biorreactor tipo *air-lift*. La duración total del cultivo fue de 15 días y se recolectaron muestras cada 2 días de manera de determinar la densidad celular y las concentraciones de lípidos y de glucosa. Se realizaron 2 alimentaciones con medio de cultivo estéril para reestablecer el volumen original de 300 mL: a los días 5 (25 mL) y 13 (40 mL).

Resultados

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: ambas respuestas se ajustaron con modelos cúbicos, cuyos valores asociados de probabilidad fueron $<1 \times 10^{-4}$ y 0,013, para las respuestas L y DC, respectivamente. Los R^2 obtenidos fueron 0,941 y 0,833 para las respuestas L y DC, respectivamente, lo cual indica que los modelos explican un alto porcentaje de la variabilidad del sistema. Los 3 factores evaluados fueron significativos para ambas respuestas. Se observó un marcado efecto positivo de Cu sobre la concentración de lípidos, lo cual podría ser explicado por el hecho de que el cobre es un cofactor de las enzimas encargadas de la síntesis de lípidos.

Posteriormente, se aplicó la función deseabilidad global para obtener la combinación óptima de los factores. Los criterios empleados fueron minimizar la densidad celular y maximizar la concentración de lípidos de manera que los nutrientes sean destinados, principalmente, a la generación de lípidos. La combinación óptima sugerida fue: CC 33,30 gL^{-1} , CN 33,10 y Cu 1,00 mgL^{-1} , y los correspondientes valores predichos para las respuestas fueron: L 40,88 ppm y DC $1,41 \times 10^7$ céls mL^{-1} , con un valor de $D = 0,944$.

Los resultados predichos fueron comprobados mediante experimentos independientes obteniéndose una densidad celular de $2,14 \times 10^7$ céls mL^{-1} y una concentración de lípidos de 35,7 ppm.

Finalmente, se procedió a realizar un cultivo de la cepa de *Chlorella* sp. en un biorreactor tipo *air lift* que fue previamente caracterizado. El medio de cultivo empleado fue la formulación óptima. La Figura 1 muestra la evolución de la densidad celular y de las concentraciones de glucosa, lípidos y oxígeno disuelto, en función del tiempo para

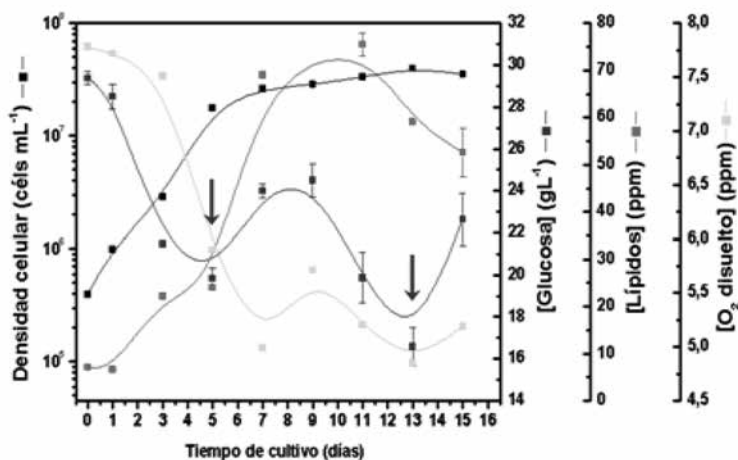
el cultivo heterotrófico de *Chlorella* sp. desarrollado en el biorreactor tipo *air-lift*, indicándose las alimentaciones de medio de cultivo estéril con flechas.

El crecimiento de microalgas fue exponencial hasta el quinto día, fase que se caracterizó por una velocidad específica de crecimiento de $0,73 \text{ d}^{-1}$. Al final de la fase de crecimiento exponencial se alcanza un valor de densidad celular de $1,8 \times 10^7$ céls mL^{-1} , 14% menos que lo obtenido en los cultivos desarrollados en frascos Erlenmeyer. Por otro lado, la mayor concentración de lípidos obtenida fue de 75 ppm (día 11), 110% más respecto a lo obtenido en cultivos estáticos

de 10 mL. Luego, la concentración de lípidos desciende debido, quizás, a que son consumidos por la microalga. La concentración de oxígeno disuelto no llegó a ser nula en ningún período, por lo tanto no existió un ambiente de anaerobiosis que pudiera provocar limitación del crecimiento.

Conclusiones

Se optimizó la composición de un medio de cultivo específico para la maximización de la producción de lípidos en *Chlorella* sp. Dicho medio fue escalado satisfactoriamente en un biorreactor tipo *air-lift*, obteniéndose un aumento en la acumulación de lípidos.



C4 • Estudio de actividades pectolíticas producidas por *Aspergillus sojae* en cultivos sólidos utilizando residuos agroindustriales

Keman, D.^{2,*} • Özdemir, Ö.^{2,*} • Fratebianchi de la Parra, D.¹ • Cavalitto, S.¹

¹ CINDEFI (UNLP – CONICET). Calles 50 y 115, B1900ASH, La Plata, Argentina.

² Department of Food Engineering, Izmir Institute of Technology, Urla, Izmir 35430, Turquía.

*Contribución igualitaria de ambos autores en el trabajo realizado. E-mail: dantefratebianchi@gmail.com

Introducción

La creciente demanda de energía a nivel mundial ha hecho volcar la atención hacia la utilización de recursos renovables, más específicamente residuos agroindustriales y forestales, cuyos componentes mayoritarios son celulosa, xilano, almidón, lignina y pectina. Además, la utilización de estos compuestos ayuda a solucionar problemas de contaminación asociados al desecho de los mismos. Estos materiales se encuentran naturalmente disponibles en abundancia, y son varios los microorganismos capaces de utilizarlos como fuente de carbono y energía produciendo una amplia variedad de enzimas, tales como celulasas, xilanasas, ligninasas, amilasas y pectinasas. Entre estas últimas se destacan las poligalacturonasas, pectin-liasas y pectinesterasas, -debido a que actúan sobre el esqueleto de la pectina- y son producidas mayoritariamente por hongos filamentosos.

Las pectinasas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, y su producción es llevada a cabo tanto en cultivos sumergidos como en cultivos sólidos. Las fermentaciones en sustrato sólido (FSS) permiten la utilización de una amplia variedad de residuos agroindustriales, además de requerir de un equipamiento más sencillo y ser procesos de menor costo operativo en comparación con las fermentaciones sumergidas.

El objetivo de este trabajo fue la expresión de diferentes actividades pectolíticas por parte del hongo filamentoso *Aspergillus sojae* ATCC 20235, en fermentaciones en sustrato sólido utilizando diferentes residuos agroindustriales.

Metodología

Cultivos en placas de Petri: Los cultivos fueron realizados en placas de Petri conteniendo una mezcla de 5 gramos de los sustratos sólidos y 7,5 ml de HCl 0,2 M. Los sustratos ensayados fueron los siguientes:

- Afrecho de trigo
- Afrecho de trigo (90%) + Cáscara de naranja (10%)
- Afrecho de trigo (90%) + Cáscara de lima (10%)
- Cáscara de soja
- Cáscara de soja (90%) + Cáscara de lima (10%)
- Cáscara de lima
- Cáscara de soja (90%) + Cáscara de naranja (10%)
- Cáscara de naranja

El medio de cultivo que resultó ser más adecuado para la producción de las actividades pectolíticas ensayadas fue utilizado para estudiar, por un lado el efecto de la acidez durante el pretratamiento térmico del sustrato -lo cual genera medios de cultivo con distinto pH inicial -, y por otro lado el efecto del agregado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno adicional. Para esto se mezclaron 5 gramos del sustrato con 7,5 ml de HCl 0,2 M, HCl 0,1 M, o con agua destilada; por otro lado a la mezcla del sustrato con 7,5 ml de HCl 0,1 M se le adicionó 1 ó 2% p/p de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las condiciones de cultivo fueron similares a las anteriormente expuestas.

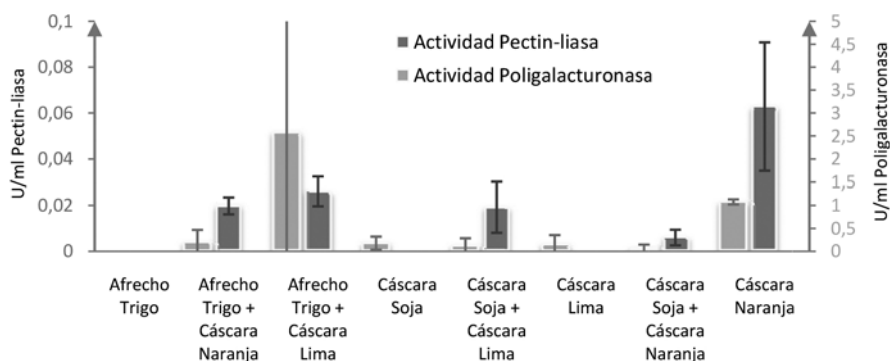
Escalamiento: El medio de cultivo optimizado fue llevado a un sistema tipo lecho empacado, que consistió en un módulo tubular con entrada y salida de aire, y permitió el realizar cultivos sólidos con 150 gramos de sustrato. La temperatura del sistema fue monitoreada con un termómetro

digital adherido al sistema, y controlada manualmente mediante la circulación de aire seco o húmedo a través del módulo.

Procesamiento de los cultivos: Finalizados los cultivos, el contenido de los mismos fue suspendido en un volumen adecuado de agua destilada o una solución de NaCl 0,1 M y agitado durante 10 minutos. Luego las suspensiones fueron filtradas por tela muselina, y centrifugadas a 6000 rpm por 15 minutos. Los sobrenadantes fueron congelados hasta uso.

Ensayos enzimáticos: Actividad poligalacturonasa fue determinada empleando ácido

poligalacturónico (PGA) como sustrato a pH 5,0 a 35°C, y midiendo el incremento de grupos reductores mediante el método de Somogyi-Nelson. Actividad pectin-liasa fue determinada empleando pectina como sustrato a 35° C y pH 3,5; 5,0 y 7,0, y midiendo la acumulación de productos Δ -4,5-insaturados a 232 nm. Actividad pectinesterasa fue determinada a pH 5,0 y 35° C, midiendo la disminución en la absorbancia a 617 nm de una solución de pectina con verde de bromocresol debida a la desesterificación de grupos carboxílicos del sustrato.



Resultados

De todos los sustratos ensayados, el más adecuado resultó ser la cáscara de naranja ya que permitió obtener los niveles más elevados de actividad poligalacturonasa y pectin-liasa, ambos a pH 5,0.

El pretratamiento térmico con diferentes concentraciones de HCl arrojó valores menores de actividades pectolíticas, siendo la condición de HCl 0,2 M la mejor condición, con valores similares a los obtenidos en el primer ensayo.

La solución de extracción más adecuada fue agua destilada pura.

El agregado de 2% p/p de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ incrementó los valores de actividad poligalacturonasa al cuádruple del valor inicialmente obtenido, pero no permitió obtener actividad pectin-liasa, por lo que no fue tenido en cuenta para el paso de escalamiento.

El medio de cultivo óptimo resultó ser cáscara de naranja pretratada con HCl 0,2 M.

Aumentando la escala de producción fue posible llegar a valores de actividad pectin-liasa similares, en U/gr cáscara de naranja,

a los obtenidos a escala de placas de Petri. No fue detectada actividad poligalacturonasa en este caso.

Conclusiones

La utilización de residuos agroindustriales como fuente de nutrientes para el crecimiento de *A. sojae* en medios sólidos

permitió la producción de actividades poligalacturonasa y pectin-liasa. Fue posible incrementar 30 veces la escala de producción de actividad pectin-liasa, aunque será necesario realizar más ensayos ajustando las variables operativas para mejorar la expresión de las actividades pectolíticas ensayadas.

C5 • Alternative low-cost fermentative medium substrate for surfactin production by *Bacillus subtilis*

Lucca, M. E.^{a,b} • Siñeriz, F.^{a*}

^a PROIMI, Belgrano y Caseros, 4000 Tucumán, Argentina, phone 54 381 4344888 ext 37. E-mail: proimiservicios@arnetbiz.com. ar

^b Microbiología Superior, Faculty of Biochemistry, Chemistry and Pharmacy, Universidad Nacional de Tucuman, Ayacucho 471, 4000 Tucumán, Argentina. E-mail: mariaesterlucca@gmail.com

* Faustino Sineriz, PROIMI, Belgrano y Caseros, 4000 Tucumán, Argentina. E-mail: fsineriz@arnet.com.ar

Biosurfactants can reduce viscosity and are suitable to emulsify the heavy crude oil in water and to improve the transportation of the low viscosity emulsion. In fact, as with any other biotechnological process the economy represents a bottleneck. Whey is composed of lactose, protein, organic acids and vitamins and it was studied as an alternative low-cost substrate for biosurfactant

production by *Bacillus subtilis*. A 7L Micro-ferm fermentor with automatic controls of ambient conditions was used. Batch fermentations with 5 L medium during 24 h with air supply and agitation were assayed. Surfactin was collected by extracting foam from the fermenter vessel during the first 15 h of fermentation. 3.20 g of total surfactin was measured in the 900 ml of collected foam (5.3 g/L) and surfactin concentration into the fermentor vessel (remaining volume 3.1 L) was 0.13 g/L which represents 0.40 g of total surfactin inside. *Bacillus subtilis* was able to produce 0.68 g/L in the cheese whey culture medium with a total surfactin production of 3.40 g and 88% of the product concentrated in the foam which is a great advantage from the technological point of view. Surfactin can be collected without centrifugation and can be added to oil recovery process as a concentrated crude extract. In conclusion, the results obtained showed that supplemented cheese whey can be used as a relatively inexpensive and economical alternative to synthetic media for biosurfactant production by *B. subtilis* in batch fermentations.

C6 • Digestión anaerobia de lodos de depuradora en dos etapas de temperatura: producción de biogás y calidad del digestato

Vicentín, R.

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC-UNL). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas CONICET. Güemes 3450 - (3000) Santa Fe (Argentina) Tel: +54 0342 455 9174/77. E-mail: rocio.vicentin@gmail.com

Introducción

Los cambios socioeconómicos de las últimas décadas, las altas concentraciones de la población en núcleos urbanos, los hábitos consumistas, el desarrollo de la industria y la agricultura, propician la producción de grandes volúmenes de residuos biomásicos que ocasionan conflictos ambientales. La digestión anaeróbica es el tratamiento biológico de los residuos, realizado en ausencia de oxígeno. Es una buena opción para dar valor a sus productos: biogás y lodo estabilizado (digestato).

La digestión anaeróbica mesofílica de los lodos de depuradora es una operación antigua y muy utilizada. Una alternativa a la digestión anaeróbica en una sola etapa es la que se realiza en dos etapas de temperatura. El primer digestor se alimenta con un sustrato de alta carga a una temperatura elevada (por lo general en 55°C) y un tiempo de retención corto y en el segundo recibe el efluente del primero a una temperatura mesofílica (típicamente 35°C). Bajo esta operación se consigue mejorar la hidrólisis de mezclas complejas, aprovechar los beneficios del sistema termofí-

lico y mesofílico y minimizar problemas de la digestión anaeróbica de una sola etapa.

El objetivo del presente trabajo es comparar resultados obtenidos por simulación de la digestión anaeróbica mesofílica versus la digestión anaeróbica en dos etapas, en términos de producción de biogás y de reducción de la fracción orgánica expresada como sólidos suspendidos volátiles (VSS), Demanda Química de Oxígeno (COD), pH y Ácidos Grasos Volátiles (VFA).

Metodología

Se utilizó el *software* GPS-X (Hydromantis Inc.) en su versión 6.0.2. para construir los diagramas de flujo y modelar los procesos. Se trata de un simulador comercial específico de tratamiento de aguas y aguas residuales. Se seleccionó la biblioteca Mantis2 que para la digestión anaeróbica combina el modelo de digestión anaeróbica UCTADM1 (Sötemann *et al.*, 2005) con el proceso de precipitación inorgánica de Musvoto *et al.* (2000).

Dado que las principales características de los barros son diferentes según la configuración que se adopte en la corriente líquida de la planta de líquidos residuales, en este trabajo se utilizó un influente de lodos de una planta convencional de barros activados para 50.000 habitantes (Ontiveros y Campanella, 2013), cuya línea de aguas posee dos fuentes de producción típicas: la decantación primaria y el binomio reactor biológico-decantación secundaria. Las principales características del influente son los Sólidos Suspendidos Totales (TSS: 7990 mg/L); Sólidos Suspendidos Volátiles (VSS: 5550 mg/L); Relación VSS/TSS: 0,694 gVSS/gTSS; Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días) 2550 mgO₂/L; Demanda Quí-

mica de Oxígeno 8990 mgCOD/L; Nitrógeno Kjeldahl 566 mgN/L, Nitrógeno Total 602 mgN/L; Fósforo Total 155 mgP/L;

El diagrama de flujo de la simulación anaeróbica de una etapa se muestra en la Figura 1, en la de dos etapas se adiciona un reactor termofílico precedente al mesofílico de la Figura 1. Los parámetros de diseño se definieron en base a la bibliografía, para evitar posibles sobrecargas y el desarrollo de condiciones sépticas (Tchobanoglous et al, 2003)

El flujo de entrada a la línea de sólidos es de 191.1 m³/d; constituido por 11.6 m³/d de barro primario y 179.09 m³/d de exceso (3%) de barro activado. Se simuló un proceso continuo, con espesado de lodo. Se

adoptó una eficiencia de 90% para el espesador. Los caudales espesado y rebose fueron 30 m³/d y 161.1 m³/d, respectivamente. Para comparar los dos procesos se fijó el tiempo de retención hidráulico en 15 días, en la simulación mesofílica el único digestor presentó un volumen de trabajo de 450 m³; mientras en la simulación de la digestión anaeróbica en dos etapas, el digestor termofílico operó a 55°C durante 3 días con un volumen de 90 m³; y durante los restantes 12 días a 35 °C en un volumen de 360 m³. Cabe aclarar que bajo condiciones termofílicas se utilizaron los parámetros cinéticos según los datos publicados por Kang et al. (2012).

Figura 1. Diagrama de Flujo de la digestión anaeróbica de simple etapa (Mesofílica)



Resultados y Conclusiones

Comparando la digestión anaeróbica mesofílica versus la digestión anaeróbica en dos etapas; en la última, la producción de biogás aumentó un 30 %. El porcentaje de remoción de la demanda química de oxígeno y de los sólidos suspendidos volátiles fueron de 47,9% y un 49,3%; algo superior a los porcentajes obtenidos bajo operación mesofílica únicamente (38,2% y 39,8 respectivamente). El pH se mantuvo en todos los casos entre 6,5 y 7,5 lo cual asegura la supervivencia de los microorganismos encargados de la producción de metano. Los ácidos grasos volátiles se

degradan en condiciones mesofílicas, sin embargo en la corriente de salida del digestor mesofílico de dos etapas, la concentración fue menor a la concentración de una sola etapa, esto indicaría una degradación parcial en la etapa termofílica generando una mejor performance en la segunda etapa. Los resultados de la simulación indican que mediante la digestión anaeróbica en dos etapas de temperatura se podrían lograr mejores resultados en términos de eliminación de demanda química de oxígeno, sólidos suspendidos volátiles, ácidos grasos volátiles y en la producción de metano.

Bibliografía

- Kang, S. J., Olmstead, K. P., Schraa, O., Rhu, D., Eum, Y. J., Kim, J. K. & Min, J. H.**, 2012. Control Parameters in an Activated Anaerobic Digestion with Membrane Filtration System. IWA.
- Musvoto, E.V., M.C. Wentzel R.E. Loewenthal, & G.A. Ekama**, (2000). "Integrated Chemical-Physical Processes Kinetic Modelling of Multiple Mineral Precipitation Problems", Water Research 34(6), 1857-1867.
- Ontiveros, G.A., & Campanella, E.A.**, 2013. Environmental performance of biological nutrient removal processes from a life cycle perspective. Bioresour. Technol. 150, 506–512.
- Riau, V., De la Rubia, M.A. & Perez, M.**, 2010. Temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) to obtain class A biosolids: A semi-continuous study. Bioresource Technology 101, 2706–2712.
- Sotemann, S.W., Ristow, N.E., Wentzel, M.C. & Ekama, G.A.**, 2005. A Steady State Model for Anaerobic Digestion of Sewage Sludges. Water SA, 31(4), 511-527.
- Tchobanoglous, G., Burton F. L., & Stensel H. D.**, 2003. Wastewater Engineering, Treatment and reuse, Fourth Edition, Metcalf & Eddy, Inc McGRAW-HILL, USA.

Sesión 3: PROCESOS EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

C1 • Tera-alternativas nanotecnológicas para el medio ambiente

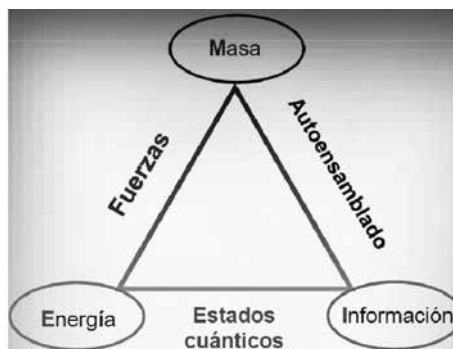
Castro, G. R.

Laboratorio de Nanobiomateriales, Instituto de Biotecnología Aplicada (CINDEFI, UNLP-CONICET, CCT La Plata), Depto. de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina. E-mail: grcastro@gmail.com

La civilización humana ha experimentado durante las dos últimas décadas una nueva cuarta revolución científico-tecnológica, la nanotecnología. Las nanotecnologías se basan en el manejo de la materia a nivel elemental, atómico, para el estudio, desarrollo y producción de novedades materiales y productos. De manera genérica, se puede definir a la nanotecnología como el uso de

la materia en el orden de tamaño cercano al micrómetro. La nanotecnología cuenta en sus bases con el estudio y manipulación de tres elementos fundamentales, a saber: materia, información y energía de la materia, los cuales están relacionados mediante fuerzas, procesos de autoensablado y estados cuánticos (Figura 1).

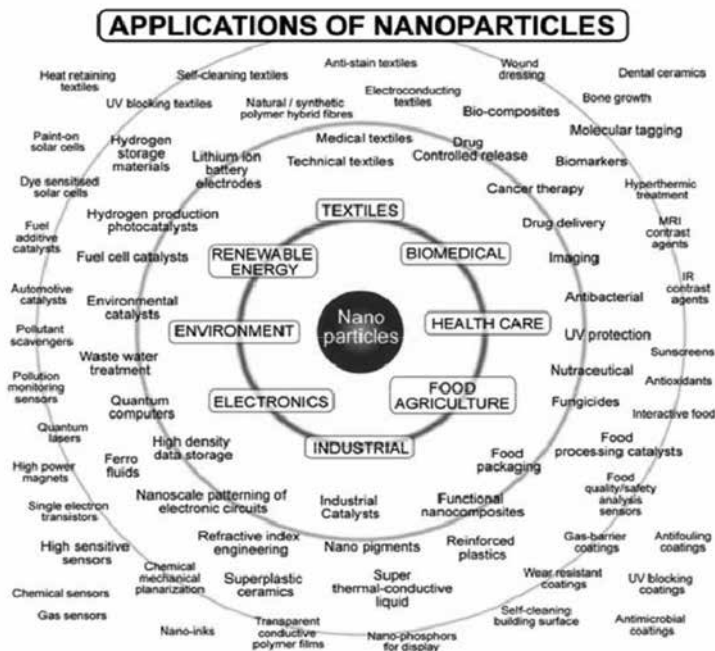
Figura 1. Elementos fundamentales de la nanotecnología.



Las nanotecnologías a nivel industrial poseen tres áreas básicas de aplicación: la formulación de nuevos materiales y su estudio, la producción de nanomateriales de uso intermedio, componentes en la manufactura de diversos productos y por último el producto final que es lo directamente observable por el consumidor. Como ejemplo de estos tres elementos podemos mencionar el desarrollo de materiales y/o superficies hidrofóbicas para vidrios y pare-

des, nanopartículas metálicas con actividades antimicrobianas como parte de las formulaciones de desodorantes, y los procesadores de computadoras. Entre los nanoobjetos más empleados a nivel industrial podemos mencionar a las nanopartículas, los nanotubos de carbono, las nanopelículas, y los puntos cuánticos, aunque hay muchas más estructuras nanotecnológicas definidas. En la Figura 2 se observa el uso potencial solo de nanopartículas metálicas.

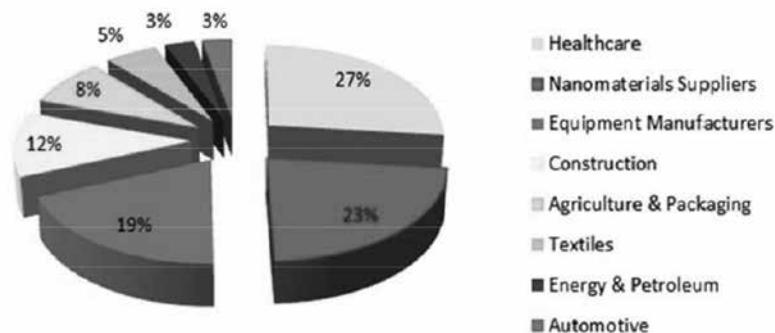
Figura 2. Aplicaciones potenciales de nanopartículas metálicas (Fuente: Suzuki, 2009).



Actualmente existen cerca de 2.000 productos de base nanotecnológica en el mercado de consumo e involucran diferentes áreas productivas: alimentos, cosméticos, farmacéuticas, automóviles, aviónica, construcción, electrónica, energía, etc. En la

Figura 3 se muestra las aplicaciones de las nanotecnologías por sector productivo. Se han producido a lo largo de estos últimos años más 30.000 patentes muchas de las cuales han participado consorcios de universidades y empresas.

Figura 3. Aplicaciones de nanoobjetos por sector sector productivo



Si consideramos que las nanotecnologías por su definición y características es el manejo intensivo de la materia a nivel atómico para la elaboración de productos de alto valor agregado, podemos mencionar que la primera contribución al medio ambiente es la producir industrias sustentables mediante el desarrollo de tecnologías de autocorrección de fallas en la producción (empleando mecanismos de autoensablado molecular) y a través del monitoreo de toda la cadena producción (materia prima, control y modelado de procesos). Estos mecanismos permiten reducir drásticamente la producción de desechos industriales, lo que implica una reducción del uso de materia prima y su manufactura; y en una segunda mirada podemos observar que también disminuirá su tratamiento de residuos con un elevado beneficio económico y ambiental.

Entre los principales usos de la nanotecnología aplicada al medio ambiente debemos destacar el desarrollo de nanosensores que permitan detectar *on-line* la presencia de una gran variedad de compuestos tóxicos con alta especificidad

y selectividad. Los nanosensores están siendo desarrollados para su aplicación en diversas industrias mediante la estructuración de redes neurales. Un ejemplo es su uso en las industrias lácteas para determinar en leches composición, calidad, adulteración y contaminación microbiana; en calidad de aguas y aire presencia de partículas, compuestos tóxicos (arsénico, metales pesados, radioactividad) pesticidas, toxinas, microbios, etc. En la determinación de plaguicidas en suelos y aguas. En las casas, oficinas, los sensores podrán determinar en tiempo real la presencia compuestos tóxicos como gases, agentes químicos o físicos en el aire y el agua corriente, los cuales son denominados popularmente como narices y lenguas artificiales.

Desde el punto de vista ecológico, el desarrollo de nuevas generaciones de nanosensores para su uso ambiental permitirá obtener información en tiempo real de los sistemas biológicos, su dinámica, diversidad y comportamiento espacial en un ecosistema dado, así como el impacto de las actividades antropogénicas en el medio ambiente.

La segunda mayor aplicación es en el tratamiento de efluentes, particularmente residuos industriales y cloacales a nivel residencial y a escalas urbanas de alta complejidad, mediante lodos activados desarrollados con y sobre estructuras nanotecnológicas dinámicas (nanocatalizadores, nanoestructuras antimicrobianas, adsorbentes, nanofiltros, etc.). Asimismo el tratamiento de y reutilización de residuos urbanos producto de la actividad humana. En particular, uno de los mayores desafíos actualmente está centrado en la reutilización de materiales electrónicos (computadoras, celulares, cargadores, televisores, etc.) mediante la aplicación de métodos basados en procesos bio- y nanotecnológicos.

También la nanotecnología impactará positivamente en los procesos de remediación combinando la bio- y la nano- remediación para realizar de manera más eficiente la recuperación y aprovechamiento de suelos y acuíferos contaminados (e.j. industrias mineras, metalurgia, curtiembres, agricultura intensiva, etc.).

A su vez, el aprovechamiento de energías eólicas, hidráulicas, fósiles y solares mediante el desarrollo de materiales con mínima fricción, y/o materiales superconductores evitando la dispersión de energía por transmisión, y/o almacenamiento altamente eficiente de energía.

En resumen, las nanotecnologías impactarán en nuestras vidas de manera significativa y es imperioso que nos capacitemos no solo para comprender los alcances y limita-

ciones de esta nueva revolución científico-tecnológica sino también para poder establecer el medio ambiente en el que vivimos y que dejaremos a las próximas generaciones.

Referencias

- Anónimo**, 2014. Science for environmental policy. Thematic issue: Nanomaterial's functionality. European Commission.
- Anónimo**, 2012. Aplicaciones industriales de la nanotecnología. Proyecto NANO-SME. Universidad de Oviedo, España. Fundación ITMA.
- Anónimo**, 2007. Nanotechnology and the environment. Report of the National Nanotechnology Initiative Workshop. EE.UU.
- Castro, G.R.**, 2011. Nanobiotecnología, un campo promisorio de exploración y desarrollo para nuestras sociedades. Augusto Chiaia (Editor). High training course for leaders 2010. MERCOSUR Programme – Ed. Univ. La Sapienza, Roma - Italian Government. Italy. 35 Páginas.
- Masciangioli, T., Xianzhang, W.**, 2003. Environmental Technologies at the nanoscale. Environmental Science and Technology 102-108.
- Patra, J. K., Baek, K.-H.**, 2014. Green Nanobiotechnology: factors affecting synthesis and characterization techniques. Journal of Nanomaterials, ID 417305, 12 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/417305>.
- Rickerby, D.G., Morrison, M.**, 2007. Nanotechnology and the environment: A European perspective. Science and Technology of Advanced Materials 8, 19–24.
- Tuzuki, T.**, 2009. Commercial scale production of inorganic nanoparticles. International Journal of Nanotechnology 6, 567-578.
-

C2 • Permeado de suero fermentado con gránulos de Kefir como potencial fungistático y secuestrante de aflatoxina B₁ en alimento para pollos

Gamba, R.^{1,3} • Ni Colo, C.¹; Correa, M.^{1,3} • Astoreca, A.² • Alconada, T.² • León Pelaez, A.¹ • De Antoni, G.^{1,4}

¹ Facultad de Cs. Exactas-UNLP

² CINDEFI,

³ CONICET

⁴ CIC-PBA.

E-mail: astoreca@biotec.quimica.unlp.edu.ar

El kefir es una lecahe fermentada originada hace milenios en las montañas caucásicas. Ésta posee capacidad antimicrobiana y antitumoral, entre otras. El permeado de suero es un efluente de la industria láctea que se puede fermentar con gránulos de kefir y tiene un potencial para ser aplicado como biopreservante. Algunas especies fúngicas pertenecientes al género *Aspergillus* causan grandes pérdidas en la industria alimenticia, no sólo por el deterioro que ocasionan sino también por la producción de aflatoxinas, grupo de micotoxinas que constituyen un riesgo para la salud humana y animal, siendo la aflatoxina B₁ (AFB₁) clasificada en el grupo 1A según la Agencia Internacional de Lucha contra el Cáncer. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica y conservante del permeado de suero fermentado con gránulos de kefir CIDCA AGK1 (PSFG) adicionado sobre alimento para pollos inoculado con

Aspergillus parasiticus (CMUNLP7). Además, se estudió el efecto del PSFG sobre la producción de AFB₁ por dicho hongo sobre el alimento. Se adicionó el PSFG en diferentes concentraciones (100%, 65%, 50% y 25%) sobre el pienso; como control se usó alimento adicionado con 100% de permeado de suero sin fermentar y con 100% de agua destilada estéril; se secó en estufa a 50°C hasta alcanzar una actividad acuosa de 0,94-0,95. El alimento se contaminó artificialmente con una suspensión de 10⁴ conidios/ml de *A. parasiticus* CMUNLP7, aplicando 1 ml de la suspensión cada 100 g de alimento, y se observó diariamente la aparición visible del hongo. Se consideró que la resistencia a la contaminación corresponde al tiempo que transcurre hasta hacerse visible el desarrollo fúngico. Se tomaron muestras de alimento a los días 7 y 21 días para la extracción de AFB₁ y su posterior cuantificación mediante HPLC con detector de fluorescencia. Se observó que la adición del PSFG al alimento para pollos prolongó la vida útil de forma significativa al ser aplicado en una relación 1:1; siendo ésta de 4 días en los dos alimentos control y de 21 días en el alimento adicionado en dicha proporción. Además a los 7 días, se detectó 7 ppb de AFB₁ sólo en el alimento control con agua destilada mientras que a los 21 días, la AFB₁ fue detectada en el pienso adicionado con 50% y 100% de PSFG, indicando que la presencia de dosis subletales puede potenciar la capacidad aflatoxigénica del hongo.

C3 • Búsqueda, caracterización e identificación de microorganismos termófilos con capacidad queratinolítica aislados de muestras del campo geotermal domuyo

Cavello, I. • Segretin, A.B. • Urbieta, S. • Donati, E. • Cavalitto, S.

Cindefi (UNLP-CONICET-LA plata) calle 50 y 115. La plata (b1900ash). E-mail: icavello@biotec.Quimica.Unlp.Edu.Ar

Introducción

La queratina, proteína estructural, fibrosa e insoluble es el principal componente de la piel y sus apéndices (pelos, plumas, uñas, cuernos, pezuñas y lana) cuya características principales son su gran estabilidad y resistencia a la degradación por parte de proteasas comunes debido a su empaquetamiento compacto y a la presencia de puentes disulfuro en su molécula. Las plumas son uno de los principales residuos de naturaleza queratínica producidos por actividades agroindustriales y presentan un serio problema ambiental debido a su escasa utilidad como materia prima y la consecuente necesidad de disposición.

Las queratinasas (E.C.3.4.99.xx) son una clase particular de proteasas que presentan la capacidad de degradar la queratina, presentan una gran especificidad de sustratos y son activas frente a sustratos proteicos solubles e insolubles. En virtud a esta amplia especificidad, robustez y diversas propiedades bioquímicas, son actualmente consideradas como los nuevos biocatalizadores con potenciales aplicaciones en varias industrias: además de poder reemplazar a las proteasas convencionales en las aplicaciones industriales; son de inmensa utilidad en sectores como

el del reciclaje de residuos, especialmente las plumas, en el sector de curtido de pieles, en la industria textil, para el desarrollo de fertilizantes y en la cosmética. Siendo las más recientes aplicaciones de las enzimas su uso en la descontaminación de priones y como potenciador ungueal.

El desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos requiere la búsqueda permanente de nuevos microorganismos y nuevas enzimas. Debido a esto, el estudio de los ambientes extremos y su biodiversidad microbiana ha recibido un gran impulso. En particular, los termófilos son los microorganismos capaces de desarrollarse a temperaturas superiores a 45°C. Las investigaciones sobre los microorganismos termófilos han adquirido gran relevancia debido a las potenciales aplicaciones biotecnológicas de estas especies y a las ventajas que presenta el desarrollo de bioprocesos a alta temperatura. Sin embargo, una pequeña fracción de la diversidad microbiana –en cuanto a la producción de enzimas extremófilas- en ambientes extremos ha sido investigada hasta el momento.

El siguiente trabajo presenta la búsqueda de microorganismos queratinolíticos, su caracterización e identificación a partir de muestras del campo geotermal Domuyo.

Metodología

1. Búsqueda y caracterización de cepas productoras de queratinasas.

Para la búsqueda de microorganismos queratinolíticos se trabajó con muestras provenientes de las zonas con actividad termal denominadas Las Olletas y Los tachos (aguas y biofilms). Se seleccionaron aquellas muestras tomadas de regiones de alta temperatura (50-60°C) y pH neutro. En un primer enriquecimiento se sembraron 10 ml

o 1 g de muestra en 100 ml de caldo nutritivo, incubándose a 50°C, 150 rpm hasta observar crecimiento microbiano. Diez ml del primer enriquecimiento fueron luego transferidos a 100 ml de un medio mineral mínimo suplementado con 10 g/l de plumas como fuente de carbono, nitrógeno y energía incubando nuevamente a 50°C y 150 rpm. Luego de 48 h, aquellos cultivos donde se observó degradación parcial o total de las plumas fueron repicados sobre agar nutritivo con el fin de observar la diversidad microbiana. Se seleccionaron todas las colonias que presentaron diferencias morfológicas entre sí, las cuales fueron purificadas mediante repiques sucesivos en agar nutritivo.

Las colonias aisladas se sometieron a un screening proteolítico utilizando agar leche. Aquellas colonias que luego de 48 h de incubación a 50°C mostraron un halo de degradación distintivo fueron consideradas productoras de proteasas y se seleccionaron para un último paso de selección.

Dado que el screening utilizando agar leche ofrece una aproximación preliminar al permitir separar entre las cepas productoras y no productoras de proteasas, aquellas que mostraron actividad proteolítica fueron sometidas de manera individual a un nuevo cultivo líquido con plumas como sustrato. Para ello, 100 µl de un pre-inóculo fueron sembrados en 20 ml de medio mineral mínimo suplementado con 10 g/l de plumas (50°C, 150 rpm). Los cultivos se observaron diariamente en búsqueda de aquellos microorganismos capaces de degradar efectivamente de las plumas.

2. Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas seleccionadas.

La caracterización fenotípica de las bacterias seleccionadas se llevó a cabo reali-

zando diferentes pruebas bioquímicas entre las que se incluyó: tinción de gram, producción de catalasas y oxidasas, movilidad, producción de esporos, hidrólisis de almidón, fermentación de hidratos de carbono, y otras, siguiendo los protocolos descritos en el Manual Bergey (9º edición). Sumada a la caracterización fenotípica, algunos de los microorganismos seleccionados fueron además identificados filogenéticamente mediante la amplificación y secuenciación del gen 16S del ARNr.

Resultados

De un total de 28 aislamientos, 20 fueron capaces de crecer y producir un halo de hidrólisis en agar leche a 50°C entre las 24-48 h. Cuando se sometió a cada uno de estos aislamientos al test de producción de queratinasas, se observó que al cabo de 24-36 h a 50°C, el 50% de ellos degradaron completamente las plumas. En tanto que, un 25% lo hizo al cabo de 5 días de cultivo y el 25% restante no fue capaz de degradarla. De la identificación de 9 de los aislamientos queratinolíticos por secuenciación del gen ARNr 16S se observa que 4 de ellos presentaron un 99% de homología con *Bacillus licheniformis*, 2 de ellos con *Aneuribacillus migulanus* (99% de homología), 2 con *Paenibacillus dendritiformis* (97 y 99 % de homología) en tanto que 1 presentó un 99% de homología con *Bacillus citotoxicus* (Tabla1). En cuanto a la capacidad degradadora las cepas *B. citotoxicus* CIN-16, *B. licheniformis* CIN-2 y CIN-13 fueron capaces de degradar completamente las plumas al cabo de 24 h, siendo éste el primer reporte de la producción de queratinasas por parte de la especie *B. citotoxicus*.

Tabla 1. Identificación molecular de los aislamientos en base a la secuencia del 16S rDNA

Aislamiento	Identidad en secuencia	% Similitud	% Homología	N° Acceso en Genbank
2	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	100	KF862030
4	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	99	100	HQ625389.
6	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	100	GU584875
9	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	99	100	DQ156991
10	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	97	98	HQ625389
12	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	99	100	KF612002
13	<i>Bacillus licheniformis</i>	96	97	GQ340512
16	<i>Bacillus cytotoxicus</i>	99	100	NR_074914
21	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	99	JF303026

Conclusión

Este trabajo resulta ser el primero relacionado con la búsqueda de microorganismos termófilos, en particular de aquellos con actividad queratinolítica, asociados a la región geotermal de Domuyo. Entre ellos se

encuentran microorganismos que hasta hoy no han sido reportados como queratinolíticos, tales como *B. cytotoxicus*, *P. dendritiformis* y *A. migulanus*, siendo éste su primer reporte.

C4 • Producción en fase semi-sólida de lacasa de *pycnoporus sanguineus*: Una etapa hacia el tratamiento de efluentes industriales

Gioia, L. • Menéndez, P. • Ovsejevi, K. • Manta, C.

Facultad de Química-Universidad de la República, Av. General Flores 2124, Montevideo, Uruguay. E-mail: larigi83@gmail.com

Introducción

El presente trabajo es una primera etapa para el desarrollo de nuevos biocatalizadores insolubles en base a lacasas fúngicas, para su posterior escalado y aplicación en la reducción del impacto ambiental generado por efluentes de las industrias textil y papelera.

Las lacasas (EC1.10.3.2) son oxidasas producidas principalmente por basidiomicetes de la podredumbre blanca de la madera de forma extracelular. Para su actividad catalítica utilizan el oxígeno del aire como aceptor de electrones y producen agua como único producto secundario de reacción^{1,2}. Dichas enzimas actúan sobre un amplio rango de sustratos, oxidando orto- y para-difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas y aminas aromáticas, presentando una baja especificidad. Además es posible ampliar el rango de sustratos, mediante el uso de compuestos que actúan como mediadores redox.

Dadas estas características, se ha optimizado la producción de una lacasa utilizando una cepa de *Pycnoporus sanguineus*, aislada en zonas de plantaciones de *Eucalyptus* de nuestro país. Se utilizó el

cultivo en fase semi-sólida dado que permite obtener una mayor actividad enzimática en un menor volumen de medio, y además, se lo considera más adecuado dado que reproduce las condiciones naturales donde crecen los hongos ligninolíticos. Se destaca la utilización de material lignocelulósico en el medio de cultivo, cuya degradación puede liberar eficientes inductores naturales, lo que contribuye no sólo a disminuir los costos de producción sino que además posibilita el aprovechamiento de residuos de la industria forestal^{3,4}. Con la lacasa obtenida se realizaron estudios preliminares en solución de degradación de colorantes sintéticos utilizados en la industria textil.

Además, la enzima fue purificada y caracterizada, determinando propiedades relevantes para su aplicación, como ser condiciones óptimas de catálisis y estabilidad.

Metodología

- Optimización del cultivo en fase semi-sólida de la cepa de *Pycnoporus sanguineus*.

- Se estudió el efecto del material lignocelulósico utilizado como sustrato sólido del medio de cultivo (madera y corteza de *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus dunii*), así como el efecto del pH del medio en la producción de lacasa. Se estudió el efecto de compuestos fenólicos como posibles inductores de la producción de lacasa por el hongo. Los compuestos utilizados fueron: 4-metilpirocatecol, pirocatecol, pirogalol, ácido gálico (1 mM). También se estudió el efecto del pirocatecol en dos concentraciones (1 y 4 mM) y de la adición de tiamina (5 mg/L).

- Purificación y caracterización de la lacasa producida por la cepa de *P. sanguineus*

- El protocolo optimizado para la purificación de la enzima consta de 3 etapas: precipitación salina de las proteínas del y

Reactive Black sobrenadante del medio de cultivo, seguida de una diálisis del precipitado resuspendido y finalmente cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharose. Se evaluó la purificación mediante electroforesis desnaturante SDS-PAGE y por determinación de la actividad específica de las fracciones en las distintas etapas del proceso de purificación. Para la caracterización de la enzima purificada se determinaron las constantes cinéticas (K_M y $V_{m\acute{a}x}$), el punto isoeléctrico mediante isoelectroenfoque, las condiciones óptimas de catálisis y la estabilidad con el pH y la temperatura. Estos ensayos se realizaron con el sustrato ABTS.

- Degradación de colorantes sintéticos con el sobrenadante del cultivo optimizado.

- Se estudió la decoloración de Acid Red 88 (AR88), Lanaset Grey (LG) y Reactive Black 5 (RB5); el grado de decoloración se determinó a partir del espectro de absorción en la región visible de cada colorante, midiendo la disminución del área del pico a la longitud de onda de máxima absorbancia. Se estudió el efecto de mediadores redox, tanto sintéticos como ácido violúrico y hidroxibenzotriazol, así como de origen natural como metilsiringato y acetovanillona.

Resultados

Se pudo observar que en la producción de lacasa, la combinación sustrato-pH con la que se obtuvo mayor actividad fue corteza de *E. grandis* - pH 3,0; y que en todos los casos con pH 3,0 se obtuvo mayor actividad. El agregado de compuestos fenólicos al medio, así como de vitamina B12 no tuvo efecto significativo.

Se logró purificar la enzima 25 veces, lo cual se confirmó mediante electroforesis desnaturante SDS-PAGE. El pI de la

enzima purificada está en el entorno de 3, presentando una $K_M = 0,037$ mM y una $V_{m\acute{a}x} = 0,098$ μ moles ABTS/min.mL.

La enzima purificada presentó un rango de pH óptimo entre 1,5 - 3,0 y un 100% de estabilidad en el rango de pH 4,0 - 8,0 luego de 24 hs de incubación.

La enzima purificada mantuvo entre 80-100% de su actividad en un rango de temperatura entre 0- 50°C luego de 1 hora de incubación a pH 6.

La lacasa producida fue capaz de degradar los colorantes ensayados (Fig.1). El colorante AR88 se decoloró un 70% en 24 h sin mediadores. La adición del medio dormetilsiringato permitió alcanzar un 98% de degradación en 5 min. Para la degradación de los colorantes RB5 y LG fue necesaria la presencia de mediadores. Los mejores resultados se obtuvieron para RB5 con metilsiringato -70% en 5 min-, y para LG con el mediador ácido violúrico -60% en 2h.

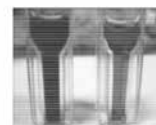
Fig. 1. Colorantes sintéticos tratados con lacasa de *Psanguineus*.



Acid Red 88 (36ppm)



Reactive Black 5 (67ppm)



Lanaset Grey G (100ppm)

Conclusiones

El mejor material lignocelulósico para utilizar como sustrato es la corteza de *Eucalyptus grandis* a pH 3,0. A partir del cultivo optimizado en medio semi-sólido de la cepa de *Pycnoporus sanguineus* fue posible aislar una lacasa y diseñar un protocolo para su purificación con el que se logró aumentar 25 veces el grado de pureza. Además, se pudo determinar las características ciné-

ticas así como condiciones óptimas de actividad y estabilidad de la enzima.

La optimización de la producción de esta lacasa y los promisorios resultados obtenidos en la degradación de colorantes sintéticos, hacen de esta enzima una excelente herramienta para el diseño de procesos biotecnológicos que requieran reacciones redox para su desarrollo.

C5 • Evaluación del crecimiento y supervivencia de burkholderia tropica para su uso como inoculante

López, A. C.¹ • Bernabe, P. R.¹ • García, S. S.¹ • Boiardi, J. L.¹ • Luna, M. F.^{1,2*}

¹ CINDEFI-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas-UNLP, 50 e/115 y 116. La Plata, Bs As, CP 1900

² CIC-PBA. E-mail: maffla@quimica.unlp.edu.ar

Introducción

El incremento de las prácticas agropecuarias condujo al aumento del uso de agroquímicos para asegurar la productividad de los cultivos. No obstante, estos productos tienen un impacto negativo sobre el medio ambiente, y por eso es muy importante buscar alternativas a su uso que aseguren la sustentabilidad y la productividad de este sector. Una alternativa prometedora

que propone la biotecnología es el uso de inoculantes microbianos como biofertilizantes, fitoestimulantes o biocontroladores. Los inoculantes son productos tecnológicos cuyo principio activo es un microorganismo vivo (bacterias u hongos) que interacciona con las plantas mejorando la nutrición y el crecimiento vegetal con la posibilidad de obtener elevados rendimientos agrícolas y al mismo tiempo preservar el ambiente (Álvarez y Sanjuán, 2007). Entre las Bacterias Promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) con potencial uso como inoculantes encontramos diferentes especies dentro de los géneros *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Gluconacetobacter*, entre otros (Dobbelaere *et al.*, 2003). Un problema que se encuentra a menudo en la mayoría de los experimentos a campo e invernadero realizados con BPCV es la inconsistencia de la respuesta de las plantas a la inoculación, siendo entonces poco probable garantizar el éxito del experimento. Esta falta de respuesta es atribuida generalmente a una ineficiente colonización (Lugtenberg *et al.*, 2001). Una exitosa colonización de la rizosfera y de la raíz de la planta es requerida para que las BPCV puedan ejercer sus efectos promotores del crecimiento. La colonización de la raíz es un complejo proceso que ocurre bajo la influencia de varios parámetros tales como la cepa bacteriana, los exudados de la raíz, factores bióticos y abióticos, entre otros. El conocimiento de la participación de cada uno de estos factores en la interacción planta-microorganismo permitirá el diseño de técnicas de inoculación más efectivas. Un aspecto poco estudiado es el referido a la dosis y concentración de inoculo requerida para que las BPCV colonicen eficientemente las raíces y, en el caso de las

endófitas, para que ingresen a los tejidos internos. También se conoce poco sobre el número de microorganismos por semilla o plántula que se requieren para obtener una respuesta vegetal positiva. Otro aspecto importante a considerar en un potencial inoculante es la evaluación de la supervivencia en el medio soporte del mismo y en la semilla, ya que, dependiendo de las condiciones edafoclimáticas y de las características propias de la especie vegetal, el período de supervivencia hasta la germinación puede ser extenso. En este trabajo se presenta la evaluación del crecimiento y supervivencia en envases plásticos y semillas de trigo de *B. tropica* Mto-293, diazótrofo endófito natural de maíz y tomate (Reis *et al.*, 2004) con características de promotor del crecimiento vegetal, con el objetivo de conducir a una aplicación más eficiente del mismo como inoculante en cultivos de cereales.

Metodología

- *Evaluación del crecimiento*: el crecimiento de *B. tropica* Mto-293 en cultivos batch en biorreactores fue evaluado en una serie de ensayos con el objetivo de obtener suspensiones de alta concentración celular y que se mantengan viables por un largo período de tiempo. Se realizaron cultivos batch de *B. tropica* Mto-293 en medio LGI pH 6.0 modificando la calidad de la fuente de Carbono (glucosa, glicerol) y de Nitrógeno ($\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ o extracto de levadura), sin control de pH. Se tomaron muestras de todos los cultivos a distintos tiempos, se midió el pH y se estimó el crecimiento por medidas de $\text{DO}_{560 \text{ nm}}$ en función del tiempo.

- *Ensayos de supervivencia en medios líquidos*: la supervivencia de *B. tropica* MTo293 se evaluó en envases plásticos estériles con y sin el agregado de protecto-

res para su conservación (Alcohol polivinílico 10 g/l; Gelatina 10 g/l y Goma Xantano 3 g/l) por el término de un año. Para ello, se creció *B. tropica* en medio LGI modificado (con glicerol 10 g/l y extracto de levadura 2 g/l) a 30°C y 150 rpm durante 48 horas. El cultivo sin aditivos y los tres cultivos con agregado de distintos protectores fueron envasados en bolsas plásticas estériles (150 ml c/u) y a distintos tiempos post-ensado se realizó el recuento de células viables. Además, a estos mismos tiempos, se inocularon semillas de trigo variedad Baguette 9 con cada tratamiento, se colocaron en frascos con solución de Fåhraeus agarizada y se llevaron a invernadero con luz y temperatura controladas para evaluar la colonización de las raíces a los 7 días post-inoculación (PI).

- *Ensayo de supervivencia en semilla:* la supervivencia de *B. tropica* en semillas de trigo variedad Baguette 9 se determinó en presencia o no de protector (Sacarosa 80% y jarabe de maltosa 1:1; 140 ml/100 kg de semillas) y de fungicida (Carbendazim + Thiram; 250 ml/ 100 kg de semillas). Las semillas se inocularon a razón de 600 ml/100 kg y se conservaron en bolsas de papel. Se realizó recuento de viables en la superficie de las semillas a distintos tiempos post-inoculación (0, 24 y 48 horas). Para ello se tomaron 10 gramos de semillas de cada tratamiento y se colocaron en 100 ml de solución fisiológica con Tween 80, se agitaron por 30 minutos a 250 rpm y luego se plaquearon las diluciones correspondientes en medio LGI agarizado para determinar células viables por semilla.

- *Ensayo de dosis:* el efecto de la dosis de inóculo sobre la colonización se evaluó tanto en el cultivo sin diluir (recuento final de aprox. 10⁹ UFC/ml) como en 3 diluciones del

mismo (10⁻², 10⁻⁴ y 10⁻⁶). Para ello 150 gramos de semillas de trigo se colocaron en bolsas de polietileno y se inocularon con una mezcla de 0,9 ml de inóculo y 2,1 ml de agua destilada estéril y luego se agitaron para que todas las semillas entren en contacto con el inóculo. Las semillas inoculadas con las distintas dosis se colocaron en frascos con solución de Fåhraeus agarizada para evaluar la colonización de las raíces.

Resultados y Conclusiones

-Con todos los medios de cultivo se obtuvieron concentraciones finales del orden de 1.10⁹ UFC / ml a las 48 h de crecimiento. Con glicerol y extracto de levadura no hubo cambios de pH durante el crecimiento, y por eso se empleó este medio para todos los ensayos posteriores.

-El recuento de viables en envases plásticos disminuyó con el paso del tiempo, siendo Goma xantano el aditivo que otorgó una mayor viabilidad respecto al resto. Independientemente de este resultado, al inocular semillas con los tratamientos a los distintos tiempos, se observó que *B. tropica* no perdió la capacidad de colonización endofítica y superficial de las raíces.

-*B. tropica* colonizó eficientemente tanto tejidos superficiales como internos de raíces de trigo cuando se inoculó con dosis que aseguraron 100 bacterias por semilla.

-El agregado de protector aumentó la supervivencia sobre las semillas y *B. tropica* fue compatible con el antifúngico ensayado.

Los experimentos presentados muestran el potencial de *B. tropica* para colonizar raíces de trigo de una manera eficiente, y los mismos abren la posibilidad de realizar ensayos de promoción del crecimiento con este microorganismo para su uso como inculante en estos cultivos.

6. Efecto de la temperatura y el pH en comunidades sulfato-reductoras aisladas del volcan copahue

Willis Poratti, G. • Hipperdinger, M. • Donati, E. CINDEFI (CCT LA PLATA-CONICET, UNLP), Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), Calle 50 N° 227, La Plata, Argentina.

E-mail: willis.graciana@biotec.quimica.unlp.edu.ar

Introducción

La bioprecipitación es una alternativa biológica aplicable al tratamiento de metales pesados presentes principalmente en efluentes líquidos. Se trata de la inmovilización del metal, es decir al pasaje de un estado soluble inicial a uno soluble final. Dentro de los microorganismos que se utilizan en la bioprecipitación se destacan las bacterias sulfato reductoras (BSR), que bajo condiciones de anaerobiosis son capaces de reducir el sulfato a sulfuro, utilizando compuestos orgánicos sencillos como dadores de electrones. La generación de sulfuro biogénico y de alcalinidad son la clave para su aplicación en la remediación de metales, especialmente en ambientes acuáticos, como los sulfuros metálicos correspondientes. Los sulfuros metálicos generados en estas condiciones, tienen menor volumen y son más estables que los

hidróxidos y carbonatos que se obtienen por tratamientos fisicoquímicos.

En los ambientes naturales, las BSR son importantes en los ciclos del azufre y del carbono, y coexisten con otros microorganismos tanto aerobios como anaerobios, formando comunidades microbianas o consorcios. La utilización de comunidades en los procesos biotecnológicos presenta algunas ventajas respecto de las cepas puras, ya que los microorganismos pueden realizar varias funciones y complementarse en condiciones extremas como la temperatura o el pH. Los ambientes extremos como la zona geotermal de Caviahue-Copahue (ubicada al noroeste de la provincia de Neuquén) reúnen estas características y resultan ideales para el relevamiento y aislamiento de comunidades sulfato reductoras.

En este trabajo se analiza la capacidad de reducir sulfato bajo diferentes condiciones de temperatura y pH en comunidades sulfato - reductoras obtenidas de la zona geotermal de Copahue.

Metodología

Las muestras ambientales fueron recolectadas de aquellos pozos en donde se observaba un potencial redox negativo (indicador de la presencia de un ambiente anaeróbico). Los valores de temperatura sugieren que las posibles comunidades presentes son de carácter termófilo moderado (AL1 y LMa2) y termófilo extremo (LMi).

Tabla 1. Datos fisicoquímicos de las muestras de los pozos termales y la T° de cultivo

Muestra	Temperatura (°C)	pH	Eh (mV)	Temperatura de cultivo (°C)
AL1	41	2	-200	40
LMa2	38	3	-70	40
LMi	90	5	-126	65

Una cierta cantidad de muestra se colocó en medio Postgate B a pH 7 selectivo para BSR. Los cultivos fueron incubados en condiciones anaeróbicas (agregando ácido ascórbico y ácido tioglicólico al medio) y a temperaturas cercanas al lugar de origen (Tabla 1). El crecimiento se siguió midiendo la concentración de sulfato remanente por turbidimetría y observando la formación de un precipitado negro de FeS debido al hierro (II) presente en el medio de cultivo. Para analizar el efecto del pH, las comunidades obtenidas se incubaron a la misma temperatura pero se modificó el pH del medio de cultivo a 4,5 y 5,5. Como control de crecimiento se utilizó el mismo medio pero a pH 7. En el caso de la temperatura las comunidades AL1 y LMa2 fueron incubadas a 45, 50 y 65°C. Como control se utilizó el crecimiento a 40°C. La comunidad LMi se incubó a 45 y 50°C y como control se utilizó el crecimiento a 65°C. En todos los casos el pH se mantuvo en 7. Se tomaron muestras diariamente de todos los cultivos para determinar la concentración de sulfato remanente por turbidimetría, el pH y la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Resultados y Discusión

Las tres muestras provenientes de los pozos termales de Copahue (Agua del Limón, Las Máquinas y Las Maquinitas) presentaron capacidad sulfato-reductora cuando se las cultivo en las temperaturas cercanas a su lugar de origen. En todos los casos se observó un consumo de sulfato del 80% luego de 8 días. El medio Postgate B es selectivo para este tipo de bacterias, debido a que contiene una alta concentración de sulfato, que actúa como aceptor final de los electrones, y lactato como fuente de carbono y energía. Este último, puede ser oxidado

completamente a CO₂ o incompletamente a ácido acético bajo condiciones anaerobias. Debido a que se trata de una comunidad, no se descarta el desarrollo de otro tipo de bacterias, como las acetogénicas, que puedan competir con las BSR. Por otro lado, se observó un aumento en los valores de pH lo que también es indicativo del crecimiento de estos microorganismos.

Cuando las comunidades fueron sometidas a distintos valores de pH (manteniendo la temperatura constante) se observó una pronunciada inhibición de la actividad sulfato-reductora a pH 4,5 en todas las comunidades. Los porcentajes de reducción de sulfato fueron 36% para AL1 y LMa2 y 20% para LMi. En este caso, los valores de pH se mantuvieron relativamente constantes a lo largo del cultivo. Sin embargo, la inhibición no fue tan pronunciada para los cultivos a pH 5,5 mostrando consumos de sulfato de 64, 60 y 75% para AL1, LMa2 y LMi respectivamente. Las fuentes de carbono habitualmente usadas en los enriquecimientos (ácido láctico en este caso), son pequeños ácidos orgánicos que, a bajos pH, están en forma no disociada y logran penetrar la membrana celular disociándose dentro del citoplasma y provocando inhibición parcial o total del crecimiento. En el caso del ácido láctico el valor de pKa cercano al valor del pH del medio de cultivo (4,5) produce que existan más moléculas en la forma no disociada provocándose así luego la inhibición por el pH.

La disminución de la temperatura en la comunidad LMi provocó un marcado descenso en el porcentaje de consumo de sulfato. En el cultivo crecido a 45°C y pH 7 el consumo de sulfato fue del 40%, la mitad del valor alcanzado a 65°C. La muestra que se utilizó para este enriquecimiento proviene de un pozo termal a 90°C, por lo que

es de esperar que se encuentren microorganismos sulfato-reductores ya adaptados a crecer a elevadas temperaturas. Por otro lado, se observó una diferencia en la velocidad de consumo de sulfato, siendo menor a 45°C. Para el caso de las comunidades AL1 y LMa2, la inhibición fue mayor en el caso de la primera. El consumo de sulfato disminuyó un 36% a 45 y 50°C. Sin embargo el valor de pH alcanzado y la velocidad de consumo de sulfato fueron las mismas que a 40°C.

Conclusiones

Si bien las muestras fueron recogidas de lugares con características ácidas, las

comunidades desarrolladas a pH 7 fueron inhibidas en gran medida por la disminución del pH. Esto está directamente relacionado con la utilización de la fuente de carbono y energía, por lo que no se descarta que empleando otras fuentes (como glicerol) puedan crecer a valores bajos de pH. La temperatura también juega un papel importante, debido a que las muestras que provenían de lugares en donde la temperatura era de 40°C no fueron capaces de desarrollarse de igual manera a valores mayores. Lo contrario sucedió cuando la muestra LMi fue sometida a un descenso de la temperatura.

Sesión 4: PROCESOS EN TECNOLOGÍA ENZIMÁTICA

C1 • Tecnología de molecular farming para la producción de enzimas industriales: caso quimosina

Salinas, M. • Schujman, G. E.
 BIOCERES S.A. E-mail: martin.salinas@indear.com

El uso de plantas como bioreactores para producir enzimas y otras proteínas valiosas a gran escala constituye una alternativa de producción eficiente, económica, segura y amigable con el medio ambiente. A través de la fotosíntesis, las plantas utilizan energía solar para la producción de moléculas orgánicas, utilizando el dióxido de carbono del aire. Este principio básico representa la piedra angular de la competitividad de nuestra tecnología de Molecular Farming.

Sus principales ventajas, en comparación con la fermentación clásica de bacte-

rias, hongos, levaduras, células animales y de insectos, son:

- Bajo costo de producción
- Producción a gran escala
- Uso eficiente de la energía
- Sistema de producción amigable con el ambiente
- Menor riesgo de exposición a patógenos humanos/animales

El cártamo es un cultivo ideal para el uso de esta tecnología por varios motivos: apto para el cultivo en climas semi-áridos, baja participación en la cadena alimenticia, excelentes características de bioseguridad, almacenamiento estable y subproductos de alto valor agregado.

El primer proyecto de Molecular Farming que se encuentra en producción es la recuperación de quimosina bovina expresada en semillas de cártamo genéticamente modificado para este fin. La quimosina es una proteasa bovina que se utiliza para coagular la leche en el proceso productivo de quesos.

El proceso de producción consiste en la molienda húmeda de los granos de cártamo con un buffer de extracción. En este proceso se obtienen tres fases: líquida, cuerpos grasos y fibras que son separadas por equipos centrífugos, generando los subproductos del proceso. A continuación se realizan las etapas de purificación, recuperación y formulación del producto final.

Los ensayos realizados con la quimosina producida por esta tecnología han demostrado su equivalencia con otras disponibles en el mercado en términos de estabilidad, rendimiento, pruebas funcionales y caracte-

rización bajo los parámetros de pH, concentración de calcio y temperatura.

De esta manera, y tomando como punto de partida al cártamo, el objetivo no se detiene solamente en la recuperación de proteínas recombinantes, sino en la utilización y el aprovechamiento energético integral del grano, aumentando su valor agregado con la incorporación de tecnologías asociadas al aprovechamiento de los subproductos de Molecular Farming para la producción y recuperación de diversos tipos de biomoléculas.

C2 • Proceso enzimático para la eliminación de esteril glucósidos, principales contaminantes del biodiesel

Aguirre, A • Eberhardt, M. F. • Braia, M. • Menzella, H. • Peirú, S.

Laboratorio de Ingeniería Genética y Tecnología de Fermentación (IPROBYQ-CONICET) - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531 - 2000 Rosario – Argentina.

E-mail: speiru@fbioyf.unr.edu.ar

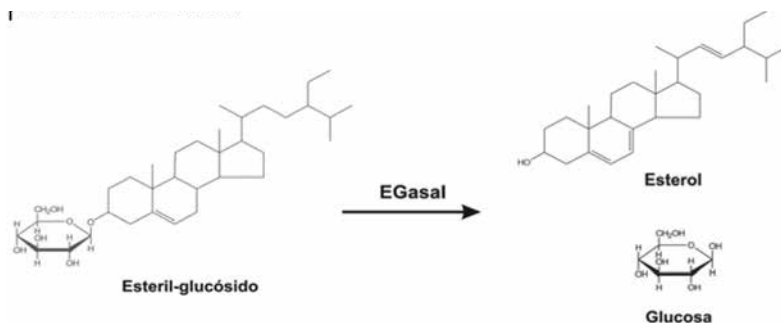
Introducción

El biodiesel es un combustible renovable, obtenido por medio de la transesterificación de aceites vegetales y grasas animales con alcoholes de bajo peso molecular. Puede reemplazar en forma directa el diesel derivado del petróleo y es el combustible líquido más eficiente que puede actualmente obtenerse a partir de la fuente de energía más abundante en la naturaleza, la luz solar.

Desafortunadamente existen aún problemas técnicos que dificultan la obten-

ción en gran escala del biodiesel con una pureza comparable a la del diesel derivado del petróleo. Uno de los problemas más importantes radica en la formación de precipitados insolubles que se obtienen durante su producción, y cuya presencia resulta en alteraciones en el funcionamiento de los motores. Los esteril glucósidos (EG) (Figura 1), compuestos naturales presentes en los aceites que se utilizan como materia prima en la elaboración de biodiesel, han sido identificados como los principales agentes causantes de estos graves inconvenientes capaces de afectar el crecimiento de la industria del biodiesel. Si bien distintas soluciones se han propuesto y son actualmente exploradas para solucionar este problema, ninguna de ellas ha sido hasta el presente plenamente satisfactoria por razones técnicas y/o económicas. En este trabajo se describe la identificación, caracterización y producción heteróloga de una enzima termofílica capaz de hidrolizar EG (Figura 1), y su implementación en un proceso de tratamiento del biodiesel.

Fig. 1. Estructuras de glucosil- β -sitosterol, el esteril glucósido más abundante en el aceite de soja, y los productos obtenidos luego de la hidrólisis catalizada por EGasa1.



Metodología

Para la obtención de la enzima, una versión sintética del gen *egasa1* con el uso de codones optimizado para *E. coli* fue clonada en un plásmido de expresión bajo el promotor pBAD y transformado en la cepa BL21AI (DE3). La proteína resultante fue purificada por tratamiento térmico y posterior cromatografía de afinidad.

El tratamiento enzimático de biodiesel en sistemas de dos fases fue realizado inicialmente en volúmenes pequeños, a temperatura y velocidad de agitación controladas, en un agitador magnético por tumbos. Una vez optimizadas las condiciones de reacción, se realizaron ensayos en mayor escala, con agitación mecánica y temperatura controlada.

La evolución de la reacción de hidrólisis de los EG en biodiesel fue monitoreada mediante dos métodos: a) Cuantificación enzimática de la glucosa producida mediante dos reacciones acopladas catalizadas por la Hexoquinasa y Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa, y posterior determinación fluorométrica del NADPH formado, y b) Cuantificación de EG mediante extracción en fase sólida del EG con cartuchos de sílica, seguido de cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (SPE-GC FID).

Una vez eliminada el agua por decantación y secado en vacío, la calidad del biodiesel procesado se evaluó por medio de las técnicas utilizadas habitualmente en la industria, establecidas por normas internacionales.

Resultados

El gen sintético *EGasa1* fue expresado eficientemente en *E. coli*, y la proteína fue posteriormente purificada a homogeneidad mediante tratamiento térmico seguido de cromatografía de afinidad en columna de Ni-NTA agarosa.

La enzima EGasa1 se utilizó para tratar biodiesel destilado derivado de aceite de soja al que se le había agregado previamente 100 ppm de EG purificado. Se optimizaron las diferentes variables del proceso, incluyendo temperatura, pH, concentración del buffer, contenido de agua, salinidad, concentración de enzima y velocidad de agitación. Las condiciones que resultaron más apropiadas para la eliminación del contaminante EG en el menor período de tiempo de incubación, fueron luego utilizadas para procesar muestras de biodiesel comercial crudo provenientes de industrias locales. La evaluación mediante SPE-GC FID evidenció la eliminación total de EG luego de 2-3 horas de incubación.

Por último se realizó el escalado del proceso desde 5 gramos hasta 10 litros de biodiesel, y se sometió a las muestras tratadas a los ensayos de control de calidad requeridos por los mercados más exigentes de este combustible: CSFT (Cold Soak Filtration Test - ASTM D7501), FBT (Filter Blocking Tendency - ASTM D2068), CSFBT (Cold Soak FBT - CAN/CGSB - 3.524) y CT (Contaminación Total, EN 12662). Los resultados obtenidos mostraron un notable aumento de la calidad debido al tratamiento enzimático, obteniéndose un comportamiento similar al del biodiesel destilado.

Conclusiones

En este trabajo se expresó la enzima glucosídica EGasa1 en *E.coli*, capaz de degradar EG, el principal contaminante del biodiesel derivado de aceites vegetales, y se optimizó el proceso de hidrólisis en el sistema de dos fases biodiesel/agua. Como resultado, se logró remover completamente los EG de muestras de biodiesel comercial en 2-3 horas de incubación. La implementación de este proceso amigable con el medio ambiente durante la producción industrial de biodiesel permitirá obtener biocombustibles de alta calidad a un bajo costo.

C3 • Glicosilación enzimática de compuestos fenólicos dirigida a su aplicación potencial en la industria farmacéutica y cosmética

Braun, L. E. • Weiz, G. • Neher, B. D. • Bedrliková, E. • Mazzaferro, L. S. • Breccia, J. INCITAP-CONICET, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam), Av. Uruguay 151, (6300) Santa Rosa, La Pampa, Argentina. E-mail: lucasbraun@exactas.unlpam.edu.ar

Introducción

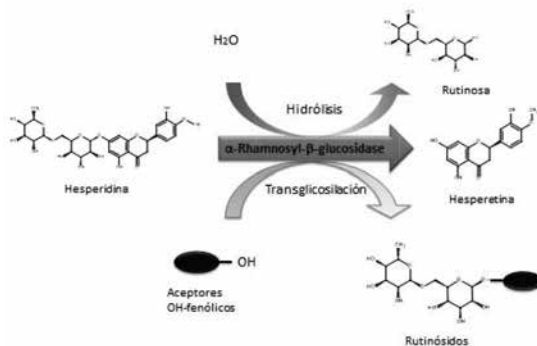
Muchos compuestos biológicamente activos (hormonas, edulcorantes, alcaloides, flavonoides, antibióticos, etc) poseen residuos glicosídicos en su estructura. Esta fracción de la molécula puede modificar las propiedades fisicoquímicas, tales como volatilidad, solubilidad, estabilidad y también resultar crucial para la actividad biológica. Por otro lado, un gran número de compuestos fenólicos y polifenólicos

con demostradas actividades farmacológicas se encuentran naturalmente glicosilados. Sin embargo, su uso fue limitado por su baja concentración en los extractos vegetales y debido a que su síntesis química o enzimática no es sencilla. Los trabajos relacionados a la transferencia de azúcares sobre oxidrilos fenólicos son escasos en la literatura científica. Aquí utilizamos el flavonoide hesperidina (subproducto de la industria citrícola) como donador del disacárido rutinoso para la transglicosilación de aceptores fenólicos con la enzima fúngica α -ramnosil- β -glucosidasa (EC 3.2.1.168).

Metodología

Para la reacción de transglicosilación se utilizó como donador del disacárido rutinoso el flavonoide hesperidina y los aceptores fenólicos: fenol, hidroquinona, catecol, resorcinol, pirogalol y floroglucinol. Reacción: 1,8 mM donador, 3,6 mM aceptor, 0.035 U/ml α -ramnosil- β -glucosidasa, 50 mM buffer ácido cítrico/citrato de sodio pH 5.0 (30°C, 2 h). Los productos de reacción fueron analizados por TLC, HPLC y NMR.

Los compuestos rutinósidos se purificaron mediante extracción líquido-líquido con acetato de etilo (1:1), liofilización y exclusión molecular (Biogel P2).



Resultados

El biocatalizador α -ramnosil- β -glucosidasa fue capaz de transglucosilar Fenol, Hidroquinona, Catecol, Resorcinol, Pirogallol y Floroglucinol en solución acuosa con rendimientos del 20, 28, 33, 34, 23, 13% respectivamente. Un reactor a escala (100 ml) para la síntesis de cada uno de los rutinósidos fue realizado con rendimientos comparables a los obtenidos en las síntesis analíticas. Los nuevos compuestos fueron purificados y su estructura confirmada por Resonancia Magnética Nuclear con el disacárido en los OH-número 1. Es interesante que solo un 1mol de rutinosa fuera transferido por mol de

aceptor, indicando la mono-sustitución y la regio-especificidad del catalizador.

Conclusiones

El proceso de transglucosilación de compuestos fenólicos tuvo lugar con eficiencias apreciables luego de 2 h a pH 5 y 30°C. Es importante señalar que estos rutinósidos no se habían descrito previamente y la obtención a escala de dichos productos permitirá una evaluación más detallada acerca de sus propiedades físico-químicas y farmacológicas.

C4 • Caracterización de clorogenato hidrolasa naturalmente inmovilizada en micelio no viable de *aspergillus niger* aku 3302

Butiuk, A. P.^{1,2} • Maidana, S. A.¹ • Martos, M. A.¹ • Hours, R. A.²

¹ Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. Félix de Azara 1552, (3300) Posadas, Misiones, Argentina.

² Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI; UNLP, CONICET La Plata), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 47 y 115 (B1900ASH), La Plata, Argentina. E-mail: anabutiuk@fceqyn.unam.edu.ar

Introducción

Clorogenato hidrolasa (CHasa, EC 3.1.1.42) cataliza la hidrólisis de ácido clorogénico (ACG), liberando ácidos quínicos y cafeico, productos de alto interés y valor comercial que no se producen en nuestro país. CHasa es una enzima intracelular, inducible, producida por diferentes géneros fúngicos, i.e.: *Aspergillus*. En estudios previos encontramos que *A. niger* AKU 3302 (provisto por el Prof. J. Ogawa, Univ. de Kyoto, Japón) forma pellets con elevada actividad CHasa al crecer en medio líquido. El uso de estos pellets directamente como biocatalizador (enzima naturalmente inmovilizada) está condicionado por sus propiedades catalíticas, por lo que se hace necesaria su caracterización para su posterior uso. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar parcialmente a la CHasa naturalmente inmovilizada en pellets de *A. niger* AKU 3302.

Metodología

Producción de CHasa: Se cultivó la cepa de *A. niger* AKU 3302 en frascos agitados (180 rpm, 3 días, 30°C), en medio Czapek líquido, utilizando un extracto acuoso de yerba mate como inductor. Los pellets fueron separados por filtración y lavados con agua destilada.

Preparación del biocatalizador: Los pellets fúngicos fueron tratados térmicamente (30 min, 55°C) para inactivar el micelio pero preservando la actividad catalítica.

Ensayo enzimático: La actividad CHasa asociada a los pellets se determinó midiendo el cambio de A350 de una solución de ACG (1,5 mM) en buffer fosfato de sodio (BFS; 50 mM, pH óptimo), durante 15 min, a 30°C en agitador alternativo (100 golpes/min). Una unidad de actividad CHasa

se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de ACG por min bajo las condiciones del ensayo.

Caracterización del biocatalizador: La posible ocurrencia de limitaciones en la transferencia de masa externa fue evaluada midiendo el efecto de la velocidad de agitación (0 a 200 golpes/min) sobre la conversión del ACG. El pH y la temperatura óptimos de actividad CHasa se determinaron midiendo la actividad enzimática a diferentes pHs y temperaturas. El efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad de la enzima se determinaron por preincubación de la enzima en ausencia de sustrato, a diferentes valores de pH y temperaturas y posterior determinación de la actividad enzimática residual. Los parámetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ y K_m fueron determinados a partir de medidas de velocidad inicial empleando ACG como sustrato, al pH óptimo y a 30°C. Para determinar la estabilidad operacional, luego de cada ciclo de hidrólisis, los pellets fueron separados de la mezcla de reacción, lavados con buffer BFS (50 mM, pH óptimo) y reintroducidos en una nueva mezcla de reacción. La actividad enzimática residual fue determinada bajo condiciones estándar.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados son presentados como promedio \pm desvío estándar.

Resultados

El porcentaje de conversión de ACG se incrementó con la velocidad de agitación hasta los 20 min aproximadamente y a partir de este tiempo no se registraron incrementos a velocidades superiores a los 100 golpes/min (Fig. 1A). Se determinaron los valores de las constantes de tiempo de reacción (t_r) y tiempo de difusión (t_d) para estimar si existen limitaciones difusionales,

siendo $tr \gg td$ por lo que la reacción no es influenciada por la transferencia de masa.

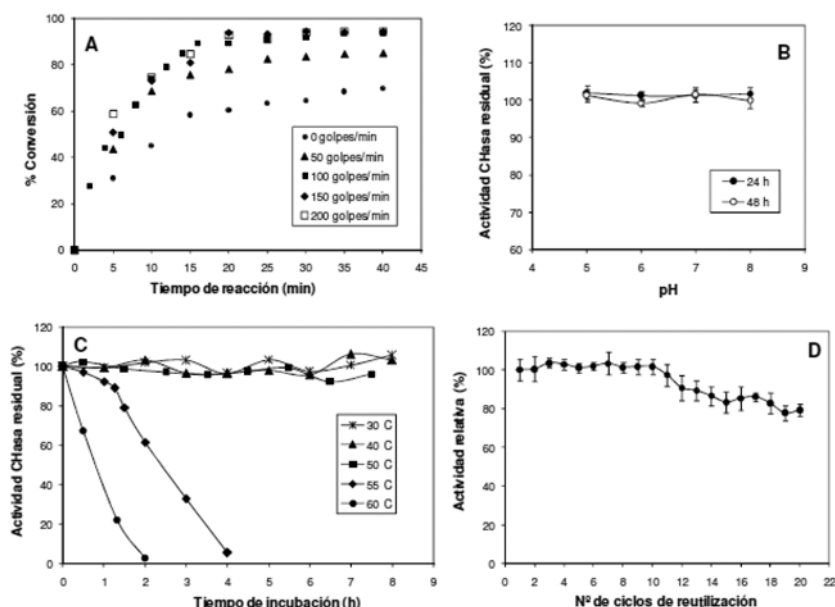
CHasa asociada a los pellets exhibió máxima actividad a pH 6,5 y a 50°C, con un valor de energía de activación de 11,36 kJ/mol (determinada utilizando una expresión del tipo Arrhenius) (datos no mostrados). La enzima permaneció estable en el rango de pHs entre 5,0 y 8,0 luego de ser incubada en BFS durante 48 h, a 5°C (Fig. 1B).

La enzima permaneció estable hasta 50°C luego de haber sido incubada durante 8 h a pH óptimo. A partir de 55°C la enzima perdió estabilidad, reteniendo el 30% de su actividad inicial luego de 3 h de incubación e inactivándose completamente luego de 2 h a 60°C (Fig. 1C).

La hidrólisis de ACG por la CHasa inmovilizada en micelio de *A. niger* AKU 3302 presentó una cinética del tipo de Michaelis-Menten. Los valores de K_m y $V_{m\max}$ estimados a partir de la gráfica de Lineweaver-Burk, fueron de 1,38 mM y de 4,255 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente.

La estabilidad operacional de la CHasa inmovilizada fue determinada luego de 22 ciclos de reacción sucesivos (400 min) a 30°C. No se registró una pérdida aparente en la actividad de la enzima luego de 11 ciclos de reacción, manteniendo cerca del 80% de su actividad inicial luego de los 22 ciclos de uso reiterado (Fig. 1D).

Figura 1. (A) Efecto de la velocidad de agitación sobre la hidrólisis de ACG; (b) Efecto del pH sobre la estabilidad de CHasa; (c) Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de CHasa; (D) Estabilidad operacional de la CHasa.



Conclusiones

El uso de micelio fúngico no viable como biocatalizador presenta las ventajas que acarrear los sistemas con enzimas inmovilizadas y a la vez se superan los problemas asociados a la inmovilización artificial. En el presente estudio se obtuvo un biocatalizador con actividad CHasa, naturalmente inmovilizada en el propio micelio de *A. niger* AKU 3302. Se demostró que el mismo es

estable en un amplio rango de pHs y temperaturas siendo capaz de mantener la actividad enzimática durante varios ciclos de uso repetidos. El uso potencial de este sistema de CHasa inmovilizada podría ser de considerable importancia para la producción de ácidos quínico y cafeico a partir de la hidrólisis de ACG en un biorreactor continuo de flujo pistón.

C5 • Producción de celulasa de *aspergillus niger* en medios de cultivo sólido de olote de maíz blanco y su extracción utilizando sistemas bifásicos acuosos

Boggione, M. J. • Gómez García, R.a • Aguilar González, C. N.a • Farruggia, B. IPROByQ. "Laboratorio de Físicoquímica aplicada a la bioseparación" Área Físicoquímica. Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR

^a Dpto. Inv. Alimentos. F.Cs.Qcas. U.A. Coahuila. Mx. E-mail: mboggione@fbioyf.unr.edu.ar

La celulasa es un complejo enzimático capaz de degradar celulosa. Está conformado por la endo-1,4- β -D-glucanasa, la exo-1,4- β -D-glucanasa y la β -D-gluco-sidasa. Son enzimas de importancia biotecnológica por sus aplicaciones en las industrias alimenticia, textil, del papel, para la fermentación de biomasa en biocombustibles y en aplicaciones farmacéuticas así como en investigaciones biológicas. La producción en cultivos en medio sólido, tiene como ventaja respecto de los medios líquidos, el bajo consumo de agua y la posibilidad de utilizar desechos agroindustriales como fuentes

de carbono y soportes de crecimiento. En biotecnología los hongos se utilizan como fuente enzimática debido a la alta disponibilidad y estabilidad. *Aspergillus niger* es un hongo productor de celulasa muy utilizado industrialmente. El objetivo del presente trabajo fue producir celulasas a partir de desechos agroindustriales. Para la producción se utilizó cultivo un medio sólido de marlo de maíz blanco. Se llevó a cabo un estudio cinético del crecimiento del hongo sobre el soporte. Se determinó pH, proteínas, actividad enzimática cada 12 horas durante 96 horas desde el momento del agregado del inóculo. Para determinar actividad celulasa se realizaron determinaciones cuantitativas y cualitativas de las 3 enzimas que forman el complejo. El pH del cultivo se mantuvo en un rango de 3.8 - 4.8 observándose un mínimo a las 36 h. Se determinó actividad endoglucanasa por método cualitativo en placas de agar utilizando carboximetilcelulosa como sustrato y rojo congo para revelar la actividad. Se obtuvieron halos claros de mayor diámetro a mayores tiempos del cultivo aunque la actividad no pudo ser cuantificada, probablemente debido al alto contenido de azúcares del medio. Se obtuvo la máxima actividad exoglucanasa (papel de filtro Whatman Nro.1) y β -glucosidasa (sus-

trato p-nitrofenil β : 1-4 glucopiranosido) a las 60 h, siendo de 190,75 U/L y de 430,46 U/L respectivamente. A las 96 h se obtuvo la máxima cantidad de proteína siendo de 0,7973 mg/g de soporte. La actividad específica fue máxima a las 36 h para exoglucanasa y a las 60 h para β -glucosidasa siendo éstas de 0,6136 U/mg y 1,8838 U/mg respectivamente. Se determinaron la productividad volumétrica y específica de exoglucanasa y β -glucosidasa. La productividad volumétrica resultó máxima a las 60 h para exoglucanasa y β -glucosidasa, siendo de 3,1792 U/L h y 12,99 U/L h respectivamente. La productividad específica de exoglucanasa fue máxima a las 36 h, siendo de $3,32 \cdot 10^{-2}$ U/ mg h. La productividad específica de β -glucosidasa alcanzó el máximo a las 60 horas, obteniéndose un valor $3,14 \cdot 10^{-2}$ U/ mg h.

El proceso de recuperación, purificación y separación de las enzimas producidas por acumulación extracelular durante el cultivo en estado sólido fue abordado utilizando sistemas bifásicos acuosos (SBAs) los cuales representan una técnica bioseparativa atractiva cuando no es necesaria una alta pureza, o en los pasos iniciales de purificación. Las ventajas se centran en la baja tensión interfacial y alto contenido de agua, lo cual provee de un ambiente favorable para la preservación de la actividad biológica de moléculas lábiles (Carvalho *et al.* 2007). Existe poca información sobre la aplicación de los SBAs para la purificación y separación de las celulasas y xilanasas. Los SBA se pueden formar al mezclar en medio acuoso dos polímeros decadena flexible (PCF) o bien un PCF y alguna sal (fosfato de potasio, sulfato de sodio, etc) por encima de cierta concentración crítica. La purificación se logra por un reparto diferenciado de la molécula blan-

coy las impurezas entre ambas fases acuosas. La elección de las condiciones experimentales adecuadas permitirá emplear los SBA para extraer una proteína blanco de una mezcla compleja, haciendo que dicha molécula se repartamayoritariamente hacia una de las fases y las que constituyen sus impurezashacia la fase contraria.

En este caso se utilizaron sistemas formados por polietilenglicol de diferentes masas molares (600, 3350 y 8000) y sales como fosfatos (Pi) y citrato (Ci) de potasio para formar los sistemas bifásicos. En ellos se produjo el reparto de un liofilizado comercial y el filtrado proveniente del medio de cultivo sólido, fueron determinadas en ambas fases las enzimas del grupo de las celulasas y las proteínas totales en todos los casos. Fueron determinados los porcentajes de rendimientos (%R) en las fases y los factores de purificación (FP) de la enzima correspondiente.

Con el liofilizado comercial los mejores resultados de purificación y recuperación se obtuvieron, para la exoglucanasa, en las fases inferiores de los sistemas PEG8000/Pi y PEG3350/Ci % de rendimientos del 70% y FP de 4,5 y 6,5 respectivamente.

Para la endoglucanasa en la fase superior de los sistemas PEG600/Pi y en la fase inferior de los PEG8000/Ci los %R en la fase inferior fueron superiores al 80% aunque con bajos FP.

La producción de celulasa fue exitosa en cultivos económicos en medio sólido los cuales requieren bajo consumo de agua, son fuente de carbono y soporte simultáneamente, en este caso utilizando marlo de maíz como producto de desecho. Los resultados además indican que la extracción selectiva de los cultivos podría mejorar las condiciones de una futura purificación de las diferentes enzimas que conforman el complejo celulolítico utilizando SBA.

C6 • Recuperación de biocatalizadores mediante técnicas de desplegamiento y replegamiento

Fenoglio C.² • Bonazza, H.¹ • Mammarella, E.^{1,2}

¹ Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (UNL-Conicet).

Predio CCT CONICET-Santa Fe. Ruta Nacional N° 168, km. 461,5. Paraje "El Pozo" (3000) Santa Fe (Argentina).

² Departamento de Ingeniería en Alimentos. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral.

Santiago del Estero 2829. (3000) Santa Fe (Argentina).

E-mail: ejoma@intec.unl.edu.ar

La principal limitante para el uso de las enzimas como biocatalizadores en procesos industriales es su relativamente corta vida media. Entre las diferentes estrategias generalmente aplicadas para incrementar la estabilidad operacional, se encuentran el rediseño molecular de la enzima, el desarrollo de técnicas de inmovilización y la modificación del medio de reacción.

La inactivación enzimática es un fenómeno complejo que tradicionalmente ha sido considerado con carácter irreversible. Sin embargo, en muchos casos es posible lograr revertirla, al menos parcialmente, desplegando completamente las estructuras enzimáticas incorrectas provocadas por la inactivación para que posteriormente la enzima se repliegue muy rápida y completamente a su estructura inicial activa.

En el caso de enzimas inmovilizadas en soportes sólidos por unión covalente multipuntual, este replegamiento se ve favorecido por el ordenamiento molecular que pro-

vocan los múltiples enlaces enzima-soporte. Si bien el replegamiento de enzimas ha sido intensamente estudiado en relación a la producción de proteínas recombinantes, su uso como estrategia de reactivación de biocatalizadores enzimáticos parcialmente inactivados no ha sido abordado de una manera sistemática desde el punto de vista de la ingeniería del proceso.

En el presente trabajo se analiza el proceso de reactivación de biocatalizadores con actividad proteásica por α -quimotripsina, que resultaron parcialmente inactivados durante su empleo en un proceso de hidrólisis de concentrado de proteínas de suero de quesería (WPC). La enzima α -quimotripsina (EC 3.4.21.1) es una serino-proteasa que hidroliza enlaces peptídicos entre aminoácidos aromáticos (Tyr, Trp, Phe, Met, Leu) desde el extremo carboxílico terminal.

Los biocatalizadores enzimáticos fueron obtenidos inmovilizando α -quimotripsina tipo II de páncreas bovino (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) sobre micropartículas de agarosa (Hispanagar S.A., Burgos, España) de 100 μ m de diámetro, activadas con glicido(2,3-epoxi-1-propanol) hasta conseguir una concentración de 75 μ eq de grupos aldehídos por cm^3 de soporte (glicil-agarosa al 6%). En estas condiciones se obtuvieron biocatalizadores con una carga de enzima de 40 mg por gramo de soporte, con una actividad enzimática inicial de 60 UI/mg soporte.

Los biocatalizadores de α -quimotripsina fueron empleados para reducir, mediante su hidrólisis, la alergenicidad de soluciones de WPC, trabajando a un valor de pH constante de 8 y 50°C, hasta alcanzar un grado de hidrólisis de 8%. Antes de someterlos al proceso de reactivación, los biocatalizadores fueron reutilizados en sucesivos proce-

sos de hidrólisis hasta alcanzar una actividad remanente del 10% de la inicial.

La reactivación de los biocatalizadores parcialmente inactivados se realizó incubando los mismos por diferentes períodos de tiempo en diferentes soluciones de urea (1 a 9M) y/o guanidina (1 a 9M) a diferentes temperaturas. Finalizado el tratamiento, se realizó el lavado de los mismos con agua destilada y se los resuspendió en buffer fosfato 100 mM de pH 8,0. Los biocatalizadores sometidos al proceso de reactivación fueron reemplazados en ensayos estándares de hidrólisis de WPC para constatar el grado de reactivación conseguido. Con la estrategia empleada, se alcanzaron resultados de entre 25 y 100% de reactivación, lográndose los mejores valores en presencia de urea 9 M o de guanidina 6 M.

Los biocatalizadores que mostraron mayores valores de reactivación fueron sometidos a análisis por difracción de rayos X para evaluar el recupero de la naturaleza estructural de la enzima inmovilizada. Para tal fin se utilizó un difractómetro de rayos X marca Seifert (Ennepatel, Alemania), modelo JSO Debyelex 2002 con goniómetro para pol-

vos Rich Seifert MZIII, equipado con tubo de cobre y filtro de níquel. Los ensayos se realizaron sometiendo a las muestras a 30 kV de tensión y 25 mA de intensidad, con un ángulo de barrido de $60 > 2\theta > 4^\circ$, a una velocidad de barrido de 1.2 $2\theta/\text{min}$ y con una constante de tiempo del rotámetro de 3 s, no encontrándose diferencias significativas entre los resultados obtenidos para los biocatalizadores recién preparados y los biocatalizadores reactivados, lo que podría indicar que se ha logrado la máxima estabilidad termodinámica. El hecho de que el proceso de reactivación sea rápido también sugiere que ese punto de referencia puede ser inducido por las uniones covalentes enzima-soporte, que permitirían conducir el proceso de replegado. En tal caso, podría asumirse que no resultaría necesario el desplegamiento total de la enzima para lograr su correcto replegamiento.

Finalmente, puede concluirse que el desplegamiento/replegamiento de enzimas inmovilizadas constituye una técnica simple, rápida, económica y efectiva para producir la reactivación de este tipo de biocatalizadores en medio acuoso.

Sesión 5: PROCESOS DE PURIFICACIÓN

C1 • Nuevos materiales para la purificación de proteínas

Grasselli, M.

Laboratorio de Materiales Biotecnológicos.
UNQ-IMBICE (CONICET)

La biotecnología moderna depende fuertemente de la disponibilidad de procesos eficientes, los cuales pueden generar productos (o servicios) competitivos en térmi-

nos de calidad y costo. En el estado actual de la tecnología de bioprocesos se observa un gran avance en los procesos fermentativos (en fase de madurez tecnológica) con el desarrollo y empleo de diferentes aproximaciones a la expresión de proteínas heterólogas. Sin embargo la recuperación y purificación de productos (DSP) todavía tiene un número importante de problemas a ser resueltos. Por ejemplo, entre un 50 y 80 % de los costos operativos de un proceso corresponden al DSP.

La mayoría de los procesos de DSP de bioproductos están basados en separaciones cromatográficas. La cromatografía tradicional trabaja en un compromiso entre la resolución y la capacidad. Este compromiso es requerido principalmente por diferencias entre la velocidad de transporte de masa difusional en el interior de las partículas cromatográficas y el flujo convectivo sobre su superficie. Además, la cromatografía en lecho empacado requiere de muestras clarificadas para evitar el taponamiento y el aumento de la contrapresión. La baja productividad impuesta por las limitaciones difusionales, la necesidad de múltiples etapas cromatográficas y la extensiva separación de sólidos previo a la cromatografía lleva a una situación tecnológica caracterizada por bajos rendimientos globales e incremento de los costos de producción.

En los últimos años se han descrito nuevos sistemas de captura de macromoléculas biológicas. Uno de ellos son los materiales

poliméricos monolíticos porosos, que operan de forma convectiva, reduciendo sensiblemente el tiempo de separación. Aunque su mayor ventaja es la purificación de macromoléculas de muy alto peso molecular como son los plásmidos de DNA y partículas virales. Otros materiales son los hidrogeles porosos, denominados criogeles por su forma de preparación y las membranas adsorptivas. Dado el alto costo de las estas, las aplicaciones en la industria biotecnológica se han limitado a la eliminación de impurezas que se encuentran en muy baja concentración en productos biofarmacéuticos.

Nuevos desarrollos de materiales son los cartuchos descartables de fibras de celulosa adsorptivas, que permiten la captura de proteína directamente de licores biológicos no clarificados. El bajo costo de estos materiales permitirá desarrollar módulos descartables de purificación industrial.

C2 • Diseño de péptidos cíclicos con afinidad por biomoléculas

Giudicessi, S. L.¹ • Gurevich Messina, J. G.¹
• Martínez Ceron, M. C.¹ • Saavedra, S. L.¹
• Acosta, G.² • Erra Balsells, R.³ • Albericio, F.^{2,4} • Cascone, O.¹ • Camperi, S. A.^{1*}

¹ Inst. NANOBIOTEC UBA-CONICET. Cát. Biotecnología, FFyB-UBA. Junín 956, 6° P, (1113) CABA. Argentina.

² CIBER-BBN, PCB, Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, España

³ CIHIDECAR-CONICET, DQO, FCEyN-UBA. Ciudad Universitaria, Pab. II, (1428), CABA. Argentina.

⁴ DQO, UB. Martí i Franqués 1-11, (08028), Barcelona, España.

⁵ Yachay Tech, Yachay Ciudad del Conocimiento, (100650) Urcuquí, Ecuador
E-mail: scamperi@ffy.uba.ar

Introducción

Los péptidos cíclicos con afinidad por biomoléculas son de gran interés en el desarrollo de fármacos, sistemas de diagnóstico y ligandos para cromatografía de afinidad. Su mayor rigidez estructural en comparación con sus contrapartes lineales permite el diseño de ligandos de mayor afinidad, selectividad y altamente estables. El uso de bibliotecas combinatorias peptídicas del tipo "una bolilla-un péptido" facilita la búsqueda de péptidos con afinidad

por cualquier proteína de interés. La síntesis se realiza por el método dividir-acoplar-recombinar (DAR) que consiste en dividir el soporte sólido en partes iguales, acoplar un aminoácido diferente en cada porción, mezclar las porciones y volver a dividir para el siguiente acople. Esto asegura una representación equimolecular de todos los miembros de la biblioteca combinatoria y en la que cada bolilla de resina tenga una única entidad peptídica. El *screening* se realiza colocando la proteína blanco marcada en contacto con la biblioteca y seleccionando luego las bolillas positivas. El método ideal para identificar el péptido unido a cada bolilla seleccionada es la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Previamente diseñamos una estrategia de síntesis de bibliotecas basada en unir los péptidos a las bolillas de resina a través del ancla 4-hidroximetil benzoico (HMBA). Se forma así un éster bencílico entre el ancla y el primer aminoácido. Éste es estable durante el *screening* de la biblioteca y luego se puede romper con vapor de amoníaco para liberar e identificar el péptido por MS/MS. Si bien la secuenciación de péptidos lineales es muy sencilla por MS/MS, los espectros de masa obtenidos a partir del péptidos cíclicos son muy complejos, lo que dificulta su secuenciación inequívoca. El objetivo del trabajo fue el diseño de bibliotecas de péptidos cíclicos para facilitar su identificación por MS/MS. Se plantearon dos estrategias: A) síntesis de bibliotecas de péptidos codificadas y B) bibliotecas con un sitio de apertura en el anillo.

Materiales y Métodos

Método A, bibliotecas codificadas: la estrategia consistió en: 1) inmovilizar sobre las bolillas de resina ChemMatrix el ancla

ácido 4-hidroximetilbenzoico (HMBA), 2) acoplar sobre la resina un 10-20% de Fmoc-Ala-OH y 80-90% de Fmoc-Asp[2-fenilisopropil (OPp)]-OH, 3) sobre la resina modificada sintetizar la biblioteca combinatoria por el método DAR, 4) una vez agregados todos los aminoácidos eliminar el grupo Fmoc del amino terminal con piperidina/dimetilformamida (DMF), 5) clivar específicamente el grupo protector del Asp, OPp con solución de ácido trifluoroacético (TFA) 4% en diclorometano (DCM), 6) ciclar los péptidos en fase sólida a través de la formación de una unión amida entre el carboxilo del Asp y el amino terminal del péptido con benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidinofosfonio hexafluorofosfato (PyBOP), 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) y diisopropiletilamina (DIPEA), g) clivar los demás grupos protectores de cadenas laterales con TFA-triisopropil silano (TIS)-H₂O (95:2.5:2.5).

Método B, bibliotecas con sitio de apertura del anillo: el método de síntesis consistió en unir el ancla HMBA a la resina ChemMatrix; luego se incorporó como brazo espaciador Ala-Gly. Sobre el Ala-Gly-HMBA-ChemMatrix resultante se acopló Fmoc-Asp(OPp)-OH. Se siguió con la síntesis de la parte combinatoria de la biblioteca por el método DAR. Para incorporar una unión éster lábil en el ciclo se acopló ácido glicólico y posteriormente una Ala en el N-terminal. Para ciclar se eliminó el grupo protector del Asp (OPp) y se unió el ácido de la cadena lateral del Asp con el amino terminal. Una vez ciclados los péptidos, se eliminaron los demás grupos protectores de las cadenas laterales con TFA-TIS-H₂O (95:2,5:2,5).

Ambas bibliotecas fueron sometidas al *screening*. Las bolillas positivas de la biblioteca fueron aisladas y tratadas con vapor

de amoníaco para la posterior secuenciación del péptido presente en cada bolilla por MALDI-TOF MS/MS.

Resultados y Discusión

Con la estrategia A se obtuvo una biblioteca donde cada bolilla de resina tuvo un 80-90% del péptido cíclico y un 20-10% del péptido lineal con la misma secuencia que el cíclico. Éste último sirvió de código para secuenciar el péptido por MALDI-TOF MS/MS. El tratamiento con vapor de amoníaco permitió la separación de la bolilla de resina tanto del del péptido cíclico como de su contraparte lineal. La alta sensibilidad del MALDI-TOF MS/MS permitió secuenciar el código lineal de cada bolilla seleccionada y con ello deducir la secuencia del péptido cíclico. La mayor proporción de péptido cíclico con respecto al lineal favoreció la selección de bolillas que contienen los péptidos cíclicos con afinidad por la proteína de interés

El tratamiento con vapor de amoníaco en la biblioteca B permitió simultáneamente abrir el ciclo y separar el péptido de la resina. De esta manera se pudo identificar fácilmente el péptido presente en cada bolilla de resina a través de la secuenciación por MALDI-TOF MS/MS de los péptidos linealizados.

Conclusión

Ambas metodologías desarrolladas permitieron identificar las secuencias de los péptidos que interaccionaron con las biomoléculas. A diferencia de otras metodologías previamente publicadas, en las presentes estrategias no se requiere del uso de reactivos altamente peligrosos como Pd y CNBr. Debido a la sencillez de su síntesis se puede aplicar en una amplia gama de laboratorios no necesariamente expertos en síntesis orgánica.

C3 • Designing next-generation expanded bed adsorption processes

Fernandez-Lahore, M. • D'Souza, R. N. • Babu Kakarla, P. • Yelemene, V.
School of Engineering and Science, Jacobs University Bremen, Campus Ring 1, 28759 Bremen, Germany. E-mail: m.fernandez-lahore@jacobs-university.de

Abstract

EBA chromatography is a unique downstream bioprocessing unit operation which has offered remarkable advantages over other more traditional methods ever since its conception. It elegantly demonstrates the

power of integrated unit operations by simultaneously combining three separate post-harvest steps, namely, clarification, concentration, and primary purification, into a single one. The bioprocessing industry was however reluctant to adopt this promising technology in its initial stages due to several obstacles with regard to its relatively specialized operation, scale-up, as well as unfavorable hydrodynamic effects stemming from biomass-adsorbent interactions. Several major breakthroughs have since been made in EBA technology due to a combination of using heavier tungsten carbide-loaded beads as well as an enhanced flow distribution system, which make higher flow rates accessible owing to better hydrodynamics. A final

boost is added in the form of colloid theory (extended DLVO), which has been exploited by our group to fundamentally understand the basis of biomass-adsorbent interactions. The effects of solution chemistry (pH, ionic strength, salt type) as well as physico-chemical changes to the bead surface (in the form of polymer coatings) can therefore be assessed, and further verified using atomic force microscopy (AFM). We have taken a step further to demonstrate the prediction of ideal mobile phase compositions that minimize biomass-adsorbent interactions, while being robust enough to account incompatibilities with the proteins being purified (e.g., due to precipitation or aggregation). EBA has therefore reached a turning point in its matu-

rity, where processes can now be customized and designed to meet the purification requirements of several bioproducts (e.g., monoclonal antibodies).

[1] R.R. Vennapusaetal *J. Chromatogr.A* **2008**, *1181*, 9-20.

[2] R.R. Vennapusaetal *Eng. Life Sci.* **2008**, *8*, 530-539.

[3] R.R. Vennapusa et al *Sep. Sci. Technol.* **2010**, *45*, 2335-2344.

[4] R.R. Vennapusaetal *J. Biosci. Bioeng.* **2010**, *110*, 564-571.

Key-words: expanded bed adsorption, extended DLVO theory, atomic force microscopy, chromatography, antibody purification, integrated downstream processing.

C4 • Purificación de isoflavonas de soja empleando sistemas micelares de dos fases acuosas

Cordisco, E. • Haidar, C. • Nerli, B. B. • Pellegri Malpiedi, L.

Laboratorio de Físicoquímica Aplicada a Bioseparación. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531. C.P. 2000. Rosario. Argentina.

E-mail: lpellegrini@fbioyf.unr.edu.ar

Introducción

Las isoflavonas (IF) son moléculas polifenólicas cíclicas que debido a su gran semejanza estructural con el 17 β -estradiol, el principal estrógeno endógeno del cuerpo humano, también son denominadas fitoestrógenos. Además de su aplicación como estrógenos débiles, las IFs han evidenciado otras propiedades funcionales benéficas como por ejemplo potentes propiedades

antioxidantes y efectos anticancerígenos. Actualmente, los métodos tradicionales de obtención de IF a partir de granos de soja y derivados implican la utilización de grandes cantidades de solventes orgánicos, los cuales en su mayoría presentan altos grados de toxicidad o la aplicación de instrumental sofisticado, lo que resulta en un producto final de elevada relación costo/beneficio. Teniendo en cuenta que nuestro país es uno de los principales productores de soja, sería de vital importancia desarrollar metodologías sencillas, económicas y aplicables a nivel industrial para la obtención de IF a partir de granos de soja y sus derivados. La aplicación de sistemas micelares de dos fases acuosas (SMDFA) es una metodología que reúne muchos de estos requisitos. Se trata de aquellos sistemas bifásicos formados por soluciones de surfactantes que bajo ciertas condiciones de temperatura y concentración de detergente pueden separarse en dos fases inmiscibles, siendo una

de las fases más rica en micelas que la otra. En este contexto, este trabajo tiene como objetivo diseñar metodologías separativas empleando sistemas micelares de dos fases acuosas formados por Tritón X-114 (TX) y sales de aniones biodegradables para la extracción y/o concentración de isoflavonas partir de harina de soja.

Metodología

Se determinó el patrón de reparto de IF en SMDFA, caracterizados previamente en nuestro laboratorio, formados por TX y las sales tartrato de sodio (NaTart) y citrato de sodio (NaCit) pH 5,00. Luego de sembrar pequeñas alícuotas de IF comerciales, los SMDFA se mezclaron y dejaron reposar hasta alcanzar el equilibrio de reparto. Estimada la concentración de IF por medidas de absorbancia a 379 nm en cada fase (formación de complejo entre IF y $AlCl_3$), el coeficiente de reparto (K_r) fue calculado como el cociente de dichas concentraciones. Se evaluó el efecto de diferentes variables del sistema sobre el valor de K_r : concentración de NaTart o NaCit y temperatura. Aquellos SBAs que evidenciaron mayor capacidad de recuperar IF fueron seleccionados en un paso ulterior para ensayar el reparto de IF provenientes de harina de soja. En este caso la masa de harina sembrada en los SMDFA fue de un 2% de la masa total del sistema. El seguimiento del proceso extractivo se realizó a través de un diseño factorial completo 2^n , en el cual las variables independientes fueron analizadas en dos niveles (-1 y +1): temperatura (45 y 55°C), tiempo de extracción (40 y 80 min) y concentración de sal agregada (50 y 100 mM). La variable respuesta fue rendimiento (R%). Se trabajó con un nivel de significancia (p) $\leq 0,05$ y se realizaron cuatro repeticiones

en el punto central (nivel 0) para estimar la variabilidad experimental.

Resultados

En la mayoría de los sistemas ensayados se observó que las IF presentaron valores de K_r menores a uno, indicando una preferencia a repartirse hacia la fase inferior, rica en micelas. Los SMDFA formados por TX y NaCit mostraron capacidad de recuperar hasta un 76 % de IF en dicha fase, mientras que aquellos formados por TX/NaTart mostraron rendimientos de hasta 96%. En este contexto, se decidió ensayar la purificación de isoflavonas a partir de harina de soja empleando los sistemas TX/NaTart. De los resultados obtenidos en esta etapa, se obtuvo un valor máximo de rendimiento del 69% trabajando a 40°C, con 80 minutos de extracción y una concentración de NaTart de 100 mM. El análisis estadístico de dichos experimentos mostró que las tres variables estudiadas (temperatura, tiempo y concentración de NaTart) ejercieron un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento de IF. El signo de dichos efectos fue negativo para la temperatura y positivo para tiempo y concentración de sal. Estos resultados indican que un incremento en la concentración de sal empleada o en los tiempos de extracción maximizarían el rendimiento de IF en la fase inferior mientras que un aumento en la temperatura de trabajo daría lugar el efecto contrario. Los datos obtenidos del análisis de regresión fueron también utilizados para graficar las superficies de respuestas. Estas gráficas permiten visualizar la tendencia que presenta la variable respuesta, R% en nuestro caso, respecto de las variables independientes, facilitando así la optimización del proceso. En la Figura 1

se muestra la dependencia de R% en función del tiempo y la temperatura, seleccionando como variable fija la concentración de NaTart (100 mM). A partir de dicha figura puede observarse que aun no se ha alcanzado el máximo de la respuesta, sugiriendo que un segundo diseño experimental sería necesario para optimizar R%. Adicio-

nalmente, puede apreciarse que la superficie representada tiene una pendiente marcadamente positiva hacia las coordenadas de mayor tiempo y menores temperaturas, demostrando nuevamente que una maximización de la extracción de IF podría lograrse al trabajar a menores temperaturas y con mayores tiempos de extracción.

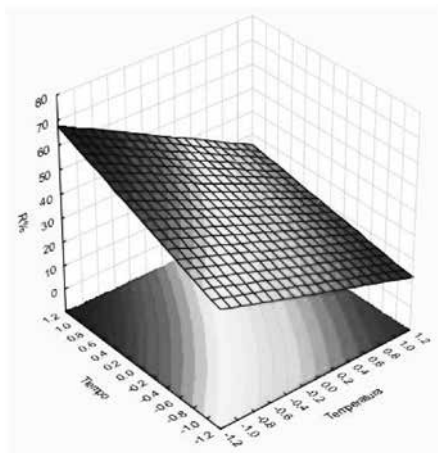


Fig. 1. Rendimiento de IF (R%) en función de temperatura y tiempo de extracción empleando SMDFA TX/NaTart pH 5,00.

Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que los SMDFA formados por TX y tartrato de sodio pH 5,00 son potencialmente aplicables en la extracción isoflavonas a partir de harina de soja. Particularmente, cuando se trabajó con una concentración de NaTart 100 mM, a 40 °C y con un tiempo de extracción de 80 minutos, pudo extraerse hasta un 70% de isoflavonas de soja en la fase inferior, rica en micelas. El hecho que IF sean recupera-

das en la fase inferior de los sistemas presenta como principal ventaja que la mayoría del los otros componentes de la harina de soja son recuperados en la fase contrario debido a su carácter hidrosoluble. Teniendo en cuenta la simplicidad de esta metodología, su bajo impacto y fácil escalado, resulta posible prever su potencial inclusión en un protocolo de purificación a nivel industrial.

C5 • Purificación de alfa-amilasa por precipitación con eudragit® e-po a partir de un cultivo líquido de *aspergillus oryzae*

Milatich, E. J. • Porfiri, M. C. • Romanini, D. Laboratorio de Físicoquímica Aplicada a la Bioseparación. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario - CONICET. Suipacha 570. Rosario. E-mail: ceciliaporfiri@conicet.gov.ar

Introducción

En sus fuentes naturales, las enzimas suelen encontrarse en muy bajas concentraciones o formando parte de una mezcla compleja de componentes. Por este motivo, el impacto económico de su obtención puede representar un elevado porcentaje dentro del costo total de un proceso biotecnológico. Para que una enzima sea aplicable industrialmente su producción debe ser económica, debiendo permanecer activa y estable en las condiciones operativas. Esto genera la necesidad de disponer de métodos de obtención y purificación de enzimas que puedan ser aplicables en macro escala empleando tecnologías sencillas, rápidas y económicas. Las enzimas microbianas son más útiles que los derivados de las plantas o animales por la gran variedad de actividades catalíticas de que disponen y porque usualmente pueden obtenerse en cantidades abundantes, a bajo costo, de forma regular y de calidad uniforme. Además, son generalmente más estables que sus homólogos animales y vegetales, y su proceso de producción es más fácil y seguro.

La enzima alfa-amilasa (α -Amy) es muy utilizada en diversas actividades industriales, como en la preparación de cervezas, panificación de harinas, como aditivo en alimentos balanceados para animales, etc. De allí la importancia de desarrollar metodologías para su purificación y concentración que cumplan con los requisitos anteriormente mencionados.

En el presente trabajo se ensayó una metodología anteriormente diseñada por este grupo de investigación basada en la precipitación de complejos reversiblemente insolubles con el polielectrolito catiónico Eudragit® E-PO (E-PO), como operación unitaria primaria de concentración y purifi-

cación de alfa-amilasa. Como fuente natural de la enzima se empleó un cultivo sumergido de *Aspergillus oryzae* donde se ha estimulado la síntesis y secreción de dicha enzima empleando almidón como fuente de carbono.

Metodologías

Los reactivos utilizados fueron: alfa-amilasa (Sigma Chem. USA), Eudragit® E-PO gentilmente cedido por EVONIK Industries a través de *Degussa Argentina* y kit comercial Amilasa 405 cinético unitest (Wiener Lab., Rosario) para la determinación de actividad amilasa.

Se estudió la cinética de formación del complejo α -Amy/E-PO a diferentes temperaturas (9, 22, 30, 40, y 50°C) a través de medidas de turbidez (Absorbancia a 400nm) cada 10 segundos, a una relación molar fija y en exceso de polímero (0,142 E-PO/ α -Amy).

Seguidamente se aplicó una metodología de purificación de α -Amy por formación de complejos insolubles con E-PO, a través de los siguientes pasos:

- 1- Sobre una solución de α -Amy en *buffer* Pi 50mM pH 5,50 se añadió E-PO hasta una relación molar óptima de 0,142 E-PO/ α -Amy.

- 2- Se incubó durante 5 minutos a diferentes temperaturas (9, 22, 30, 40, 50°C).

- 3- Se centrifugó durante 15 minutos a 1274 g y 8°C.

- 4- Se separó el sobrenadante (SN) del precipitado (PP).

- 5- Se redisolvió el precipitado por agregado de *buffer* fosfato 50 mM, pH 4,00.

- 6- Se midió la actividad enzimática en PP, SN y en un control de α -Amy sin E-PO, evaluándose los rendimientos porcentuales de precipitación respecto de este último.

Finalmente, se adaptó este diseño experimental sobre un cultivo líquido de *Aspergillus oryzae* cuya composición se detalla en la Tabla 1. La cepa empleada fue la NRRL 694, obtenida de National Center for Agricultural Utilization Research (ARS), USDA, USA. Luego de propagar el microorganismo en Agar Papa Glucosado (cinco días,

30°C), las esporas fueron suspendidas en agua destilada e inoculadas en el medio mínimo, empleando almidón como única fuente de carbono disponible, pH 5,00. Este cultivo líquido fue incubado cuatro días en shaker rotatorio a 150 rpm y 30°C. Posteriormente fue filtrado y empleado como fuente natural de la enzima.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo mínimo

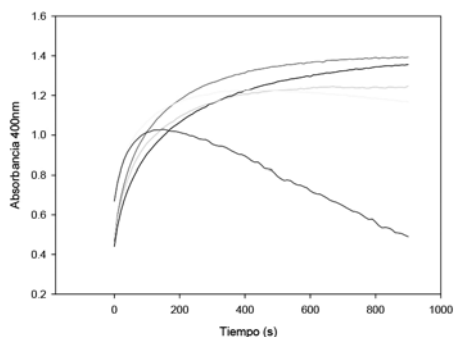
Peptona (g/L)	Urea (g/L)	Glicerol (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	MgSO ₄ (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Almidón (g/L)
1.875	1.25	0.625	0.5	0.25	0.025	17

La temperatura de precipitación fue 30°C y se adicionaron diferentes volúmenes de E-PO sobre un volumen fijo de cultivo filtrado (2 mL), determinándose para cada caso la concentración de proteínas totales (PT) y ácidos nucleicos (AN) (método de Warburg), la actividad específica (Act. esp.=Actividad_(fracción)/PT_(mg)), el factor de purificación (FP=Act Esp_(fracción)/Act esp_(cultivo)) y el rendimiento total del proceso (R%=[Actividad_(fracción)/Actividad_(cultivo)]*100).

Resultados

Las gráficas de cinética (Fig. 1) mostraron que a 50°C la formación del complejo insoluble y su consecuente precipitación es más rápida respecto de las otras T, justificando la brusca caída en la absorbancia registrada. A 30 y 40 °C, en cambio, se observa un incremento en la turbidez del sistema alcanzándose un valor constante aproximadamente luego de los 5 minutos de incubación. A temperaturas más bajas, (22 y 9°C) la formación del complejo resultó más lenta, no llegando a estabilizarse la turbidez en el período ensayado.

Figura 1. Cinética de formación del complejo □-AmyEPO a diferentes temperaturas: 9°C, 22°C, 30°C, 40°C, 50°C. Relación molar E-PO/□-Amy 0,142. Medio Buffer Pi 50mM, pH 5,50



Sin embargo, una elevada temperatura no fue favorable en términos de rendimiento de precipitación, alcanzando un máximo de aproximadamente 69% alrededor de 30°C.

La Tabla 2 muestra los resultados de purificación al aplicar la metodología de precipitación sobre el cultivo fúngico:

Tabla 2. Tabla de purificación de alfa-amilasa fúngica por precipitación con E-PO

Volumen E-PO 1% (μ l)	Fracción	[PT] (mg/ml)	[AN] (mg/ml)	Actividad (U/L)	Act. Esp. (U/mg)	FP	% R
13	PP	0,317	0,014	41,49	0,131	6,0	82,2
	SN	1,912	0,198	9,86	5,2e-3		
16	PP	0,278	0,014	42,32	0,152	7,0	83,8
	SN	1,865	0,198	10,27	5,5e-3		
19	PP	0,274	0,013	44,25	0,160	7,4	87,6
	SN	1,886	0,196	9,48	5,0e-3		
0	CONTROL	2,314	0,210	50,50	0,022	1,0	100,0

Conclusiones

Existen evidencias de un fuerte componente electrostático como responsable de la interacción proteínas/políelectrolitos. Esto puede provocar que la disminución de la temperatura favorezca su precipitación ($\Delta H < 0$). Por esta razón, a 50°C se evidencia una cinética de formación de complejo rápida. Sin embargo esta resultó ineficiente en términos de rendimiento de precipitación, teniendo en cuenta que la mecánica

de formación del precipitado también depende de la temperatura de dicha reacción. Los %R y FP obtenidos al aplicar la metodología propuesta sobre el cultivo de *Aspergillus oryzae* reflejan una marcada tendencia de la α -Amy a precipitar en las condiciones diseñadas. Esto nos permite inferir que esta técnica podría resultar adecuada para concentrar y purificar la enzima α -Amy.

C6 • Evaluation of Functionalized Polyurethane Foams as Chromatographic Adsorbents

Sánchez, M.^{a,b} • Grasselli, M.^b • Fernández-Lahore, M.^{a,*}

^a Downstream Bioprocessing Laboratory, School of Engineering and Science, Jacobs University, Campus Ring 1, D-28759 Bremen, Germany

^b Laboratorio de Materiales Biotecnológicos, Departamento de Ciencia y tecnología, Uni-

versidad de Quilmes, Roque Saenz Peña 352, Bernal, Argentina.

E-mail: misanchez@jacobs-university.de

Introduction

We have synthesized cation-exchange chromatographic adsorbents consisting of hydrogel layers supported on porous, opened, and reticulated polyurethane foams. Preliminary studies showed that the adsorptive properties of these materials

allow reversible binding of proteins by ion-exchange mechanisms. Bed hydrodynamics were studied via residence time distribution analysis using the mathematical PDE model. It allows the calculation of Péclet numbers (Pe), fraction of correctly perfused bed (ϕ), and a mass transfer term between stagnant and non-stagnant zone (N). The correlation between bed stability and performance was analyzed via the breakthrough curve of a model protein (HEWL) on the cation-exchanger matrix. Hydrodynamic and adsorptive properties were determined as a function column length, matrix density and flow velocity.

Methods

• Hydrodynamic characterization

A solution of 5% (v/v) acetone in buffer was loaded to the column with a flow-rate of 1 mL/min at a volume equivalent to approximately 1% (v/v) of the bed volume. Absorbance at 260 nm was recorded throughout the experiment. The response signals detected were translated into a RTD function and analysed by the PDE model. Model parameters were obtained by fitting the experimental curves to the theoretical modeling the Laplace domain using the expression originally developed by Villiermaux and van Swaij *et al* (1969):

$$\hat{C}(s) = [L(E(\theta))] = \frac{Pe^{1/2} \cdot \exp\left(\frac{Pe}{2}\right) \cdot \exp\left[-(Pe \cdot \phi)^{1/2}\left(s + \frac{N}{\phi} + \frac{Pe}{4\phi} - \frac{\frac{N^2}{\phi(1-\phi)}}{s + \frac{N}{(1-\phi)}}\right)^{1/2}\right]}{\frac{Pe^{1/2}}{2} + \phi^{1/2} \cdot \left(s + \frac{N}{\phi} + \frac{Pe}{4\phi} - \frac{\frac{N^2}{\phi(1-\phi)}}{s + \frac{N}{(1-\phi)}}\right)^{1/2}}$$

Back transformation to the time domain was performed using a commercial software (Mathworks Matlab® 2013a).

• Adsorptive characterization

The DBC was determined by frontal analysis. HEWL solution was pumped onto the column at a defined flow rate and the outlet absorbance at 280 nm was measured. The column was then eluted followed by washing with 10 CV of buffer A. The DBC of the porous column was calculated at 10% of the final absorbance value of the breakthrough curve:

$$q = \frac{C_0 \cdot (V - V_0)}{W_m}$$

where C_0 represents feed HEWL concentration (mg/mL); V the volume of HEWL solution pumped into the column at 10% breakthrough (mL); V_0 the dead volume of the Äkta Explorer system (mL); W_m the grams of megaporous material packed (g); q for the DBC (mg/g).

Results

Column	Linear velocity (cm.h ⁻¹)	ϕ	N	Pe
C10	210	0.63	5.72	156
	420	0.65	1.30	198
	630	0.75	4.21	196
C20	210	0.60	2.11	79
	420	0.61	5.28	106
	630	0.70	0.92	161
C30	210	0.59	3.01	113
	420	0.61	3.82	118
	630	0.67	6.26	280
C1	470	0.72	1.37	129
C2	470	0.75	1.11	139
C3	470	0.78	0.66	147

Conclusions

Results indicated that the increment of the column length led to the formation of more stagnant zones (decrease of ϕ). Nevertheless, it was seen that this effect could be avoided by the increment of the flow

rate (increment of ϕ) with the concomitant advantage of an improved DBC. The increment of the matrix density did not significantly alter hydrodynamics compared to the column length experiments. Considering the impact of flow rate on column breakthrough, a reduction of DBC values at higher flow rates is commonly observed, e.g., in matrixes like Toyopearl®GigaCapS-650MrProtein A or Sepharose® Fast Flow. However, the opposite effect is observed in our matrices. This anomalous effect is a consequence of the perfusion improvement inside the columns. While operational flow rates of commercial matrices are in the order of (200-300 cm·h⁻¹), higher DBC values reached in this work do not decrease even at flow rates of up to 600 cm·h⁻¹. We envision further studies on biomass-adsorbent interactions, with this cation-exchange material as a complementary analysis in order to confirm the viability of this support for the direct capture and purification of a range of biotechnology-derived products.

C7 • Producción de la lectina aglutinina de germen de trigo recombinante utilizando larvas de insectos como biofábricas

Urtasu, N. • Baieli, M. F. • Cascone, O. • Wolman, F. J. • Miranda, M. V.

Cátedra de Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Junín 956 (1113) CABA e Instituto de Nanobiotecnología - NANOBIOTEC (CONICET-UBA).

Email: nicourtasu@gmail.com

Introducción

Las lectinas son un grupo de proteínas ubicuas que comparten la propiedad de unir carbohidratos de forma específica y reversible. Se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza y se han identificado en bacterias, virus, plantas, vertebrados e invertebrados. La capacidad de unir de manera específica carbohidratos, hace que las lectinas posean un alto valor agregado asociado a las múltiples aplicaciones biotecnológicas en que pueden ser utilizadas. En el presente trabajo de investigación se estudió el sistema de expresión de proteínas recombinantes basado en baculovi-

rus como posible plataforma de producción de la lectina vegetal aglutinina de germen de trigo (del inglés *Wheat Germ Agglutinin*, WGA). La WGA es una proteína dimérica cuyos monómeros presentan 4 dominios unidos por 16 puentes disulfuro. El objetivo del trabajo fue establecer una estrategia para su producción y purificación a partir de larvas de *Rachiplusia nu*, lepidóptero considerado plaga de nuestro país.

Metodología

- Virus: Los baculovirus recombinantes utilizados fueron del virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcMNPV). Los mismos se generaron a partir de la recombinación de vectores de transferencia con el gen sintético de la isoforma A de WGA (WGA A) y el genoma del baculovirus occ+ (poliedrina positivo). El virus fue amplificado en cultivos celulares de Sf9 y titulado utilizando protocolos establecidos para tal fin.

- Cría de insectos: Las larvas de *R. nu* fueron adquiridas en Agldea S.A. (Pergamino, Bs. As., Argentina). Las mismas fueron criadas en nuestro laboratorio a partir de huevos o del primer o segundo estadio larval. La alimentación consistió en una dieta especial a base de soja. Se las mantuvo en una cámara a 27 °C, con una humedad del 70% y con un ciclo de luz-oscuridad de 16:8. Las larvas se criaron hasta alcanzar el último estadio larval (aproximadamente 15 días).

- Infección de larvas por vía oral: Cuando las larvas alcanzaron aproximadamente 1 cm de longitud se las hambreadó durante toda la noche. Al día siguiente, se mezclaron porciones de alimentos (0,125 cm³) con 1×10^5 poliedros purificados según protocolos ya estandarizados. A las 24 horas se las alimentó normalmente. Al 3° día se reali-

zaron homogenatos de larvas con una solución de lisis (HCl 50 mM, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, Triton X-114 4%).

- Proceso de purificación: El homogenato se calentó durante 4 min a 30 °C a fin de inducir la separación de dos fases y luego se centrifugó a 10000 x g durante 10 min a 24 °C. Se evaluaron matrices cromatográficas a base de quitosano entrecruzado con dos concentraciones diferentes de epiclorhidrina, 250 mM (CH250) y 500 mM (CH500) sintetizadas íntegramente en nuestro laboratorio. El pH de la fase superior fue ajustado a 5,0 o 8,5 y se dejó *overnight* a 24 °C en contacto con las matrices cromatográficas con agitación suave. Después de 4 lavados de 1 h a 24 °C, se procedió a la elución con una solución de ácido acético 1 M (*overnight* a 24 °C con agitación). El seguimiento del proceso de purificación se realizó por medición de WGA A a través del ensayo de ELISA de captura desarrollado en nuestro laboratorio, HPLC en fase reversa y un ensayo de hemaglutinación.

Resultados

Los niveles de expresión de WGA A alcanzados en larvas de *R. nu* fueron de $346,64 \pm 88,65 \mu\text{g}$ de WGA A/g de larva (5 larvas aproximadamente).

Para la purificación de la WGA A recombinante se diseñó una estrategia de bajo costo. Una vez obtenidos los homogenatos con un buffer de lisis conteniendo Tritón X-114, fueron sometidos a temperatura para inducir la separación de dos fases. La WGA A particionó selectivamente en la fase superior, mientras que la fase inferior (enriquecida en el detergente) concentró el *debris* celular y los lípidos presentes en el homogenato. La fase superior clarificada conteniendo el producto recombinante fue

acondicionada a pH 5,0 o 8,5 con el fin de evaluar la adsorción de la WGA A a las matrices cromatográficas CH250 y CH500. Se pudo recuperar el 80% de WGA A en un único paso y con un nivel de pureza del 75% (estimado por HPLC) con la matriz CH250, realizando la adsorción a pH 5,0. La WGA recombinante expresada en larvas *R. nu* presentó capacidad de reconocimiento de residuos glicosilados presentes en la ovoalbúmina (ELISA) y capacidad de aglutinación de glóbulos rojos humanos, evidenciando el correcto plegamiento de la proteína recombinante y la correcta formación de los 16 puentes disulfuros intracatenarios de cada monó-

mero. El nivel de WGA A expresado en este trabajo es 10 veces superior al previamente reportado en levaduras.

Conclusiones

El sistema de expresión de proteínas recombinantes basado en baculovirus y larvas de *R. nu* como biofábricas demostró ser una plataforma viable para la producción de la lectina WGA A. El costo de producir en larvas plagas es sumamente conveniente en comparación a otros sistemas tradicionales siempre que se asocie con un método de purificación sencillo y adecuado para la aplicación de la lectina.

Sesión 6: ENSEÑANZA DE LOS PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

C1 • La enseñanza de los procesos biotecnológicos en la universidad argentina

Picó, G.

Área Procesos Biotecnológicos- Departamento de Tecnología. Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos (IPROBYQ – Rosario). Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. E-mail: gpico@fbioyf.unr.edu.ar, pico@inv.rosario-conicet.gov.ar

Desde la creación de la primera carrera de Licenciatura en Biotecnología (LB), ocurrida en la U.N. de Rosario hace 25 años, hasta el presente mucho camino se ha recorrido: creación de esta carrera en diferentes universidades de nuestro país, como así también la actualización continua y vertiginosa que las mismas han sufrido. Actualmente hay seis Universidades públicas (Litoral, Rosario, Quilmes, La Plata y Tucumán) donde esta carrera se está dictando

conjuntamente con dos universidades privadas (Universidad Argentina de la Empresa y U. de Morón), además hay otras carreras similares como la Licenciatura en Biología Molecular (San Luis) Lic. en Cs. Biológicas (UBA) Ingeniería en Biotecnología (U.N. de Río Negro) e Ingeniería en Agrobiotecnología (U.N. de San Martín).

Actualmente la carrera de LB no está regulada, sin embargo existe un ente CONBIOTEC: Consorcio de Unidades Académicas con carreras de Biotecnología que pretende regular en un futuro cercano los contenidos del currículo, carga horaria, etc., algo similar a lo que ocurre en otras carreras.

El CONBIOTEC aconseja una carga horaria mínima para las carreras de Licenciatura en Biotecnología de 3380 horas, desarrolladas en un tiempo de cinco años. No establece un máximo para la carga horaria, con la finalidad de propiciar que cada Facultad en función de sus capacidades y fortalezas, pueda definir su oferta y adecuar su diseño curricular a las situaciones particulares y su contexto regional. La propuesta

de contenidos temáticos del CONBIOTEC, divide a la LB en tres periodos: uno básico, en donde se han aprovechado el dictado de asignaturas comunes con otras carreras en la misma Universidad, un ciclo superior, que le da el perfil al alumno y finalmente un ciclo complementario, basado en las fortalezas de cada universidad, conjuntamente con una práctica intensa e laboratorio denominada trabajo final de tesina. Del análisis de los programas para la LB dictadas en la Universidades mencionadas surge que existe que existe un 70-80% de contenidos temáticos comunes a todas ellas.

lezas de cada universidad, conjuntamente con una práctica intensa e laboratorio denominada trabajo final de tesina. Del análisis de los programas para la LB dictadas en la Universidades mencionadas surge que existe que existe un 70-80% de contenidos temáticos comunes a todas ellas.

Ciclo	Áreas Temáticas	Carga horaria mínima	Carga horaria total
Básico	Matemática	220	1270
	Estadística	50	
	Física	160	
	Química	584	
	Biología	250	
Superior	Bioquímica	320	1310
	Biología celular y molecular	350	
	Microbiología	200	
	Procesos Biotecnológicos	350	
Complementario	Asignaturas electivas ofrecida según las fortalezas de la institución académica	800	800
	Tesina o Trabajo final		

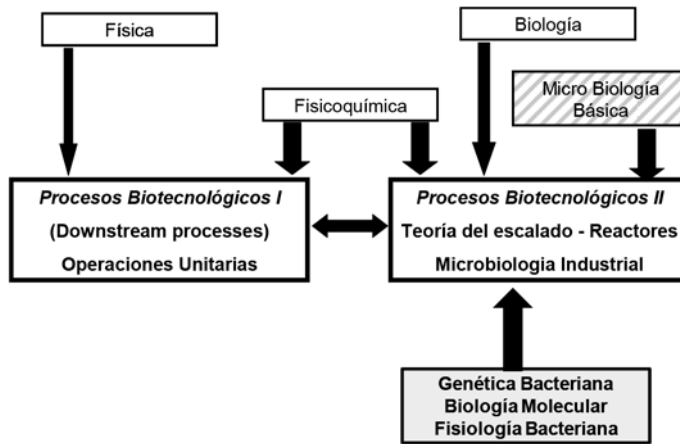
Fuente CONBIOTEC- 2012

Dentro del Ciclo superior se encuentra el espacio que ocupa el dictados de los Procesos Biotecnológicos (PB) muestra una carga horaria muy importante de 350 hs. Consecuencia que esta área temática constituye en gran medida a dar el perfil profesional del futuro egresado. En el mismo se sugiere tocar temas como: Procesos de Bioseparación en escalado. Biorreactores y fermentaciones industriales, Desarrollo de aplicaciones Biotecnológicas en salud, industria y ambiente. Obtención y desarro-

llo por ingeniería genética de bioproductos, Agrobiotecnología, Biorremediación y biodepuración.

Los contenidos temáticos desarrollados en los Ciclos básico y parte del superior, deben ser integrados al momento del dictado de la asignatura procesos biotecnológicos, esta articulación se muestra en el siguiente esquema. De esta manera un curso de PB debería contener buenos conocimientos de Física, Fisicoquímica y Microbiología Básica.

Integración de los conocimientos previos



Otro aspecto a tener en cuenta son los contenidos temáticos mínimos que se deben desarrollar en un Curso de PB. En la mayoría de las carreras los PB estas divididos en dos partes: un primer capítulo dedicado a las Operaciones Unitarias: comenzando por el principio de similitud, balances de Masas. Extracción. Reparto. Sistemas bifásicos acuosos, Filtración, Micro y Ultrafiltración, Flotación, sedimentación, Adsorción. Cromatografía en escalado. Se debe dedicar tiempo a desarrollar Operaciones Unitarias de conservación: Liofilización, esterilización y congelación. La Estabilización de enzimas es un tema importante por el amplio empleo que tiene (estructura del hielo, diagramas binarios cosolutos – agua).

Un segundo capítulo dedicado al Escalado de las Operaciones: diferentes caminos para escalar: relación de potencia

constante, tiempo de mezclado constante. Reactores: discontinuos y continuos, Crecimiento microbiano - Tipos de Biorreactores: discontinuos y continuos. Transferencia de Oxígeno. Diseño de medios de cultivo para procesos de fermentación. Mejoramiento de cepas productoras. Biología sintética aplicada al mejoramiento y la obtención de nuevos microorganismos industriales.

Perspectivas futuras en la enseñanza de los PB: debido al desarrollo de otras aéreas que aportan sus conocimientos a los PB, deberíamos introducir en la enseñanza de los PB los siguientes temas: - Biología Sintética con el objetivo de mejorar la producción de enzimas. - Recuperación de moléculas a partir de residuos no aprovechados de las industrias locales: agricultura e industria frigorífica. - Fermentación en estado sólido. - Cuidado del medio ambiente de los residuos que generan los PB.

C2 • ¡Abran cancha! Tics en el aula de purificación de proteínas

Cálcena, E. N. • Carbajal, M. L.

Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes (UNQ). R. Sáenz Peña 352, Bernal (CP1876), Bs.As., Argentina. E-mail: eugenioalcena@gmail.com; mlcarbajal@unq.edu.ar

Introducción

La asignatura Recuperación y Purificación de Proteínas (RPP) pertenece al núcleo electivo de la Licenciatura en Biotecnología de la UNQ y se encuadra dentro del área de conocimiento de la Biotecnología Industrial y los Bioprocesos. Cuenta con una modalidad de cursada totalmente presencial y de carácter teórico-experimental, con una carga horaria de seis horas por semana distribuidas en dieciocho encuentros (dos por semana). Algunos contenidos que se desarrollan en RPP son: 1) Introducción al *dowstream processing*, 2) Ruptura celular, 3) Separaciones sólido-líquido (filtración, sedimentación y centrifugación), 4) Precipitación, 5) Partición en dos fases acuosas, 6) Cromatografías no adsortivas y adsortivas, 7) Cromatografía preparativa, 8) Cromatografía convectiva, 9) Diseño y optimización de procesos de purificación.

Durante el desarrollo de la cursada de RPP se hace énfasis en la experimentación como el factor fundamental para favorecer un aprendizaje significativo. En consecuencia, una gran proporción de la carga horaria de RPP (unas $\frac{3}{4}$ partes) es destinada a actividades experimentales de laboratorio y seminarios. Debido al número de encuentros y la cantidad de contenidos de RPP se genera una cursada altamente dinámica (un

tema por semana en promedio) provocando dos fenómenos que afectan negativamente el aprendizaje de los estudiantes. Por un lado la cantidad de tiempo en encuentros presenciales se hace insuficiente para atender diversas necesidades de los estudiantes y por otro, la velocidad de cambio en los temas genera que el canal presencial de comunicación sea lento para ciertas consultas. En respuesta a los inconvenientes mencionados surge la idea de utilizar herramientas informáticas para implementar espacios virtuales, con el objetivo de complementar al espacio presencial. Este apoyo virtual se hace relevante tanto en la cantidad de tiempo como en la velocidad de comunicación, otorgando mayor tiempo de contacto entre docentes y estudiantes, así como una comunicación con *feedback* más veloz y frecuente.

La idea de utilizar un espacio virtual se puede materializar utilizando espacios informales y descentralizados con herramientas que no fueron diseñadas ni adaptadas para cubrir las necesidades específicas del contexto educativo (facebook, foros, correo electrónico, blogs, páginas web, etc.) o mediante herramientas adaptadas a fines educativos. En la UNQ existe la posibilidad de contar con un campus virtual adaptado a necesidades educativas específicas que permite la generación de un espacio virtual dentro de un marco institucional formal. Así se logra institucionalizar el contacto con los estudiantes por fuera de los encuentros presenciales, como también aumentar su sentido de pertenencia para con la Institución. El campus de la Universidad Virtual de Quilmes (UVQ) es pionero en el uso de la plataforma *moodle* (denominándola *goodle*) desde hace más de 10 años.

Desde el año 2012 y hasta la fecha (seis cuatrimestres continuados) se utiliza un aula virtual (AV) complementaria en RPP, consideramos que la implementación de esta herramienta se encuentra afianzada y consolidada. En este trabajo se pretende realizar una evaluación de la práctica de enseñanza-aprendizaje dentro de este entorno, a partir del análisis de datos recolectados mediante una encuesta de opinión a estudiantes que participaron de diferentes cursos de RPP (con y sin AV complementaria). Se busca determinar si la incorporación y uso del AV resultó de impacto positivo en el dictado de RPP (una asignatura de carácter netamente presencial), así como también detectar puntos críticos y puntos débiles para trabajar en su mejora. Se espera que la incorporación del AV otorgue a la cursada una mayor fluidez, permitiendo adaptarse mejor a situaciones como feriados y asuetos que interrumpen los encuentros presenciales. Se estima que la adaptación de los estudiantes a la herramienta será positiva.

Metodología

Como metodología para recoger datos se empleó la realización de encuestas de opinión a estudiantes de RPP (de cursadas desde el año 2004 hasta la actualidad), seguida de un análisis estadístico propio para cada curso virtual, obteniendo entonces indicadores tanto cualitativos como cuantitativos. La encuesta se creó con la herramienta de libre acceso *google forms* (formulario completo en: <http://goo.gl/forms/P9YFpvePk6>) y se envió vía correo electrónico. El universo de aplicación fueron 81 estudiantes que cursaron o estén cursando la asignatura. El análisis estadístico se realizó con datos obtenidos de estadís-

ticas y registros de actividad propios de la plataforma *goodle*.

Resultados

De los estudiantes encuestados, el 36% cursó RPP con AV y el 64% sin ella. El 21% usó un AV por primera vez en RPP (A1) y 15% ya había tenido otras experiencias en AV (A2). Un 35% nunca usó ningún AV (B1) y un 29% utilizó aulas virtuales pero no en RPP (B2).

Al los grupos A1 y A2 se les consultó sobre la dificultad de adaptación al AV de RPP. Para ambos grupos se encontraron resultados similares, aproximadamente dos tercios consideran que fue fácil y un tercio habla de dificultad intermedia. En cuanto a las ventajas del AV, la mayoría de las menciones refieren al acceso a material y comunicación y solo un 12% a ninguna ventaja. En dificultades se ubica en primer lugar a la claridad del AV en cuanto a su uso; pero un 48% de las menciones se refieren a ninguna dificultad. Los usos más comunes del aula de RPP son para descarga de material (90%) y realización de actividades (76%), aunque no es menor el porcentaje que utiliza el aula para aportar contenido (38%) y consultar información variada (31%).

Al grupo B1 se le consultó si le parece que serviría implementar una AV para RPP, obteniendo que un 36% responde afirmativamente y la mitad (18%) negativamente.

Al grupo B2 se le preguntó sobre la dificultad de adaptación, ventajas, desventajas y recursos útiles de las aulas virtuales utilizadas. Ninguno consideró difícil la adaptación, al 62% le resultó fácil y al 33% de dificultad intermedia. Entre las ventajas más nombradas prevalecen las referidas a la facilidad de acceso a recursos y al uso

del tiempo, solo el 6% no encuentra ventajas. Las desventajas más frecuentes refieren a dificultades de comunicación y organización, pero un 48% alude ninguna desventaja. Los recursos más útiles tienen que ver con el acceso a material (28%) y a consultas (15%).

Las estadísticas con datos internos del campus sobre las últimas 3 AV activas muestran coincidencia con lo encontrado en las encuestas a estudiantes; siendo los recursos de avisos del profesor y foro abierto los que más concentran visitas (80% sobre el total).

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos podemos decir que para los estudiantes, la incorporación del AV en RPP resultó en una mejora en la comunicación y en el acceso a los materiales, impactando positivamente en el desarrollo de su aprendizaje. Además, la mitad no detectó desventajas significativas en el uso del AV mientras que aquellos

que las encontraron refirieron en su mayoría a la claridad de uso de la plataforma *goodle*. Aquí podemos encontrar entonces, un punto crítico de mejora, con lo cual proponemos en próximas cursadas realizar una pequeña introducción al uso de la plataforma. Se podría trabajar en forma de taller en aulas con PC, creemos que de esta manera agilizaremos la curva de aprendizaje de la plataforma y la facilidad de uso por parte de los estudiantes; tal vez logrando aumentar aún más la proporción de aquellos a los que les resulta fácil. Como propuesta futura, también sondearemos a los docentes de la asignatura para indagar sobre su percepción en este mismo proceso.

Agradecimientos

EC y MLC agradecen al Dr. Mariano Grasselli, docente titular de la asignatura por el espacio y oportunidades de crecimiento, como también al IMBICE-CONICET.

C3 • Usina aplicada a la enseñanza del *downstream processing* de proteínas de interés industrial

Martínez-Cerón, M. C. • Giudicessi, S. L. • Saavedra, S. L. • Cascone, O. • Camperi, S. A.
 Instituto NANOBIOTEC, UBA-CONICET. Cátedra de Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 6º Piso (1113) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. E-mail: camartinez@ffyba.uba.ar

Introducción

USINA (<http://usina.rec.uba.ar>) es un simulador diseñado por el Centro de Innovación en Tecnología y Pedagogía (CITEP) orientado a la enseñanza y aprendizaje en el nivel superior. USINA promueve la necesidad de pensar en algún problema de enseñanza relevante, que genere un árbol rico en ramificaciones y derivaciones. El docente, como experto en los contenidos que imparte, diseña una propuesta de enseñanza mediada tecnológicamente, por lo que USINA se convierte en una "herramienta de autor" para cada una de las propuestas. No se trata solamente de pensar en respuestas correctas o incorrectas, sino en vías posibles de resolución que conllevarán distin-

tas consecuencias. En todos los casos, en el momento final del recorrido se ofrece una devolución docente del camino recorrido.

La estructura básica de USINA está conformada por: a) un contexto: donde se plantea un problema, b) un escenario: en el cual se brinda la información acerca del rol que el alumno va a asumir dentro del problema (no necesariamente en ese orden), c) un primer problema: en donde se presenta una situación inicial o tarea a resolver, d) alternativas posibles de solución al primer problema planteado, e) materiales e información, f) toma de decisión entre las alternativas propuestas y, si la propuesta didáctica lo amerita, se plantean nuevos problemas con sus posibles soluciones hasta alcanzar una o varias respuestas correctas.

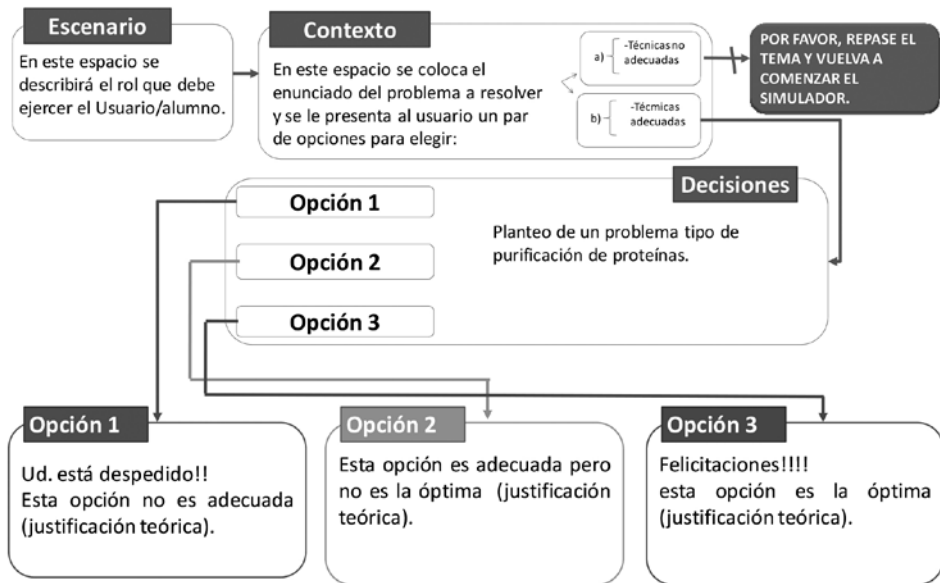
A su vez se puede presentar una pantalla en la cual se describe el "historial de decisiones", el cual consiste, una vez alcanzado uno de los posibles resultados, en la presentación de las decisiones tomadas a través de la simulación.

El diseño de procesos es un contenido aptitudinal crucial en la enseñanza de la Biotecnología. Este tipo de simuladores, como USINA, propicia dicho aprendizaje estimulando la búsqueda de estrategias superadoras y la toma de decisiones similares a las que ocurren en el campo profesional. En este trabajo planteamos la aplicación de USINA en la enseñanza de la Biotecnología y particularmente en la etapa de recuperación y purificación de productos industriales (*Downstream Processing- DSP*). Proponemos la implementación de USINA como herramienta didáctica para mejorar el aprendizaje de las distintas operaciones unitarias utilizadas en el DSP y la aplicación de las mismas en forma integrada en el diseño racional de los procesos de purificación.

Metodología

Se diseñó un diagrama de flujo para ser montado en el entorno USINA, en el cual se plantearon una serie de pantallas. La primera pantalla presenta el "Escenario", en el cual se sitúa al alumno en el rol del especialista en DSP de proteínas y al cual se le solicita que diseñe un proceso de purificación de una proteína de aplicación industrial. La proteína se encuentra en una mezcla compleja. La segunda pantalla consiste en el "Contexto", en el cual se le pide que decida qué tipo de métodos analíticos utilizaría para la caracterización de la muestra entre una batería de métodos a elección. Entre esta batería, sólo algunos métodos le serán de utilidad para la caracterización necesaria de la muestra compleja y se propicia que el alumno evalúe la metodología analítica más adecuada a su problemática. A su vez, el alumno, a lo largo del recorrido, irá obteniendo información que le permitirá caracterizar tanto las propiedades de la proteína a purificar como la de sus contaminantes. La tercera pantalla muestra el planteo del problema, en la cual se solicita, dada la información obtenida en la pantalla anterior, que se decida entre diferentes procesos de purificación. En el criterio de selección se tendrá en cuenta tanto la pureza necesaria como el costo global del proceso. Según el proceso que el alumno seleccione, éste se conducirá a una pantalla con las explicaciones de las ventajas y desventajas del diseño seleccionado. Si el alumno selecciona las opciones incorrectas o menos óptimas, la siguiente pantalla tendrá una explicación de cuál fue el inconveniente que presenta la/s opción/es elegida/s. Si la opción es la correcta llegará a una pantalla en la cual se le notifica del éxito alcanzado (Figura 1).

Figura 1. Esquema de un problema tipo de *Downstream processing* planteado en USINA.



Resultados y conclusiones

Este prototipo ha sido puesto a prueba ante diferentes personas en roles definidos (alumno, docente, experto, etc.) y planteados diversos diseños de purificación de proteínas a escala industrial. El sistema resultó conveniente como método didáctico ya que permitió andamiar los conocimientos obtenidos durante las clases de una manera más amena, amistosa y simulando el ámbito profesional. Este prototipo

permite a su vez, pensar en el futuro en una propuesta más ambiciosa en la cual se puedan integrar más temas troncales y periféricos enriqueciendo la propuesta didáctica y estimulando la capacidad y la responsabilidad del alumno al tomar decisiones. USINA puede ser fácilmente integrada al Campus Virtual que habitualmente utilizan los alumnos en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.